



ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

Departamento de Producción Vexetal

TESIS DOCTORAL

PATATA DE REEMPLERO: TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN Y SELECCIÓN Y CONDICIONES DE UTILIZACIÓN EN A LIMIA (OURENSE, GALICIA)

AUTOR:

D. Lucio García Calvo

DIRECTORA:

Dra.Cristina Cabaleiro Sobrino



ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

Departamento de Producción Vexetal

PATATA DE REEMPLERO: TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN Y SELECCIÓN Y CONDICIONES DE UTILIZACIÓN EN A LIMIA (OURENSE, GALICIA)

Memoria Presentada por:

Lucio García Calvo
Ingeniero Agrónomo

Para optar al grado de Doctor

Lugo, 27 de Julio de 2012

Lucio García Calvo

La doctora **Cristina Cabaleiro Sobrino**, profesora titular del Departamento de Producción Vegetal en la Escuela Politécnica Superior de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela, en calidad de directora,

CERTIFICA: que la presente Memoria Doctoral titulada: “**Patata de reemplazo: técnicas de producción y selección y condiciones de utilización en A Limia (Ourense, Galicia)**”, elaborada por el Ingeniero Agrónomo **Lucio García Calvo**, ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Lugo a 27 de Julio de 2012:

Cristina Cabaleiro Sobrino

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo y dedico este trabajo a todos los que han colaborado directa o indirectamente en su realización, y son muchos...

A mi directora Cristina Cabaleiro porque sin su apoyo e inestimable ayuda no hubiera sido posible llevar el trabajo a cabo.

Al sector de la patata de la comarca de A Limia, tanto agricultores, como industriales y empresas de servicios, por estar siempre dispuestos a probar e innovar.

A las dos instituciones en las que he desarrollado mi vida laboral y a su personal: INORDE y Centro Tecnológico de la Carne y Calidad Alimentaria de Galicia.

Al profesorado del departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Santiago y del grupo de investigación GI-1988, a Begoña Martín por su colaboración los ensayos de 2004 y a Paloma Pérez por su ayuda en el seguimiento e identificación de vectores. Y muy especialmente a varios estudiantes de la Escola Politécnica Superior de la USC, hoy Ingenieros Agrónomos: Carolina Couceiro, José Antonio Chao, Silvia Marnotes y Melania Magán cuyos Trabajos Fin de Carrera y/o Trabajos de Investigación Tutelados forman parte de los resultados de los Proyectos de Investigación que culminan hoy en esta tesis.

Y por último a mi familia, a Yolanda y Elena a las que les quité tiempo de compañía.

Los trabajos que constituyen esta tesis fueron parcialmente financiados por diversas instituciones, mediante los siguientes Proyectos de Investigación:

“Virosis y bacteriosis en el cultivo de la patata en Xinzo de Limia: epidemiología, diagnóstico rápido y saneamiento de ecotipos de cultivo antiguo en Galicia”. FEDER-CICYT (2000-2001).

“Estrategias de control de virosis en la producción de patata de siembra en Galicia”. Xunta de Galicia. Recursos agropecuarios PGIDIT02PR (2002-2005).

“Desenvolvemento de kits de diagnose e introdución de técnicas sostíbles de control de viroses e nematodos en patacas”. PGIDT/PGIDIT - 2010/CG870 y Agro Xinzo S.L. (2010-2012).

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág
RESUMEN	1
 INTRODUCCIÓN GENERAL	 3
1 LA PATATA Y SU PROPAGACIÓN	3
1.1 Origen y fundamento de la producción de patata de siembra	3
1.2 Producción de patata de siembra en España	6
1.3 Producción de patata y patata de siembra en Galicia	9
2 VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE LA PATATA	12
2.1 PVY	14
2.2 PLRV	15
3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	 23
 CAPITULO 1: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL MATERIAL DE REEMPLIO EN A LIMIA ENTRE 2001 Y 2003	 27
RESUMEN	27
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
 CAPITULO 2: INFLUENCIA DE LA UTILIZACIÓN DE LOTES DE REEMPLIO EN LA PRODUCCIÓN DE PATATA	 53
RESUMEN	53
INTRODUCCIÓN	53
MATERIALES Y MÉTODOS	55
RESULTADOS	57
DISCUSIÓN	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

CAPITULO 3: OPTIMIZACIÓN DE LA INMUNOIMPRESIÓN DIRECTA ELISA (DIP-ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE PVY Y PLRV EN PATATA DE REEMPLERO. KITS DE DETECCIÓN	73
RESUMEN	73
INTRODUCCIÓN	73
MATERIALES Y MÉTODOS	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
 CAPITULO 4: UTILIZACIÓN DE CULTIVOS BORDE Y ACEITES PARA EL CONTROL DE LA TRANSMISIÓN DE PVY EN CAMPOS DE PATATA PARA REEMPLERO EN A LIMIA (OURENSE)	93
RESUMEN	93
INTRODUCCIÓN	93
MATERIALES Y MÉTODOS	97
RESULTADOS	100
DISCUSIÓN	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
 CAPITULO 5: MANEJO DEL NITRÓGENO EN COBERTERA EN CULTIVOS DE PATATA DE REEMPLERO	125
RESUMEN	125
INTRODUCCIÓN	125
MATERIALES Y MÉTODOS	127
RESULTADOS	129
DISCUSIÓN	132
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
 CONCLUSIONES	137

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Normativa relacionada con la producción de patata de siembra certificada: Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra.
	7
Tabla 2	Patógenos transmitidos por el tubérculo cuya valoración contempla el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Patata de siembra
	7
Tabla 3	Patógenos de cuarentena de los que debe estar libre el tubérculo de siembra y los terrenos en los que se produce.
	8
Tabla 4	Superficie (ha) y producción (t) de patata de consumo en Galicia del 2000 al 2011.
	10
Tabla 5	Serie histórica (1966-80) de producción de patata de siembra certificada “B” precintada en Galicia. Fuente: INSPV – IXP Pataca de Galicia.
	11
Tabla 6	Distribución y transmisión de virus que infectan la patata, <i>Solanum tuberosum</i> L.
	12
Tabla 7	Principales vectores de PVY y PLRV en patata
	15
Tabla 0.1	Superficies y costes de producción medios (\pm dt) del cultivo de patata y trigo en A Limia (2011)
	24
Tabla 1.1	La patata en la provincia de Ourense (superficie, producción, semilla utilizada y reserva de siembra) en los años del estudio (2000 a 2003).
	29
Tabla 1.2	Número de lotes y agricultores participantes en el programa de evaluación de calidad de patata de reemplazo del Instituto do Campo entre 2000 y 2003.
	30
Tabla 1.3	Porcentajes máximos de virosis admitidos en la pruebas de pre y post control en material de BASE (Super élite, SE y Elite, E) y material CERTIFICADO A y B (Anexo II del Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra).
	33
Tabla 1.4	Requisitos que ha de cumplir la patata de siembra certificada. Máximos de patógenos y otros daños y deficiencias admitidos en peso (Anexo III del Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra).
	33
Tabla 2.1	Resultado del análisis serológico del material vegetal de partida (PVY y PLRV y suma de ambos, Σv) de los lotes a evaluar y producciones medias bruta (PB) y comercial (PC) ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\pm\text{dt}$) obtenidas en las tres parcelas de cada lote en 2008; recomendación (Rec) y pérdidas estimadas en función de calidad de lote (PE%); además se incluyen las

	pérdidas respecto a la PB o PC de las parcelas testigo de cada variedad (PBT% y PCT%)	58
Tabla 2.2	Resultado del análisis serológico del material vegetal de partida (PVY y PLRV y suma de ambos, Σv) de los lotes a evaluar y producciones media bruta (PB) y comercial (PC) (kg/ha \pm dt) obtenidas de las tres parcelas de cada lote en 2011; recomendación (Rec)) y pérdidas estimadas en función de calidad de lote (PE%); además se incluyen las pérdidas respecto a la PB o PC de las parcelas testigo de cada variedad (PBT% y PCT%).	59
Tabla 2.3	Resultado del análisis de correlación entre nivel de virosis de los lotes analizados y producción comercial obtenida en las parcelas de ensayo. Nivel de significación del coeficiente de Spearman (ρ)	67
Tabla 3.1	Número de muestras positivas (de 90 tubérculos) analizadas por DIP-ELISA en cuatro puntos a lo largo del brote del tubérculo y por DAS-ELISA juntando todos los fragmentos.	82
Tabla 3.2	Coste de los materiales y reactivos para analizar 45 muestras + controles (positivo y negativo) por duplicado con DIP o DAS-ELISA (1 virus).	85
Tabla 3.3	Coste de los materiales y reactivos cuando se procesan 3 membranas (45x3=135 muestras por duplicado) con el mismo anticuerpo conjugado por DIP-ELISA en comparación con el procedimiento estándar sin reutilizar anticuerpo analizando las 135 muestras por DAS-ELISA.	85
Tabla 3.4	Tiempos mínimos necesarios para el análisis de 45 muestras+controles por duplicado con DIP o DAS-ELISA	86
Tabla 3.5	Coste de los materiales y reactivos de dos modelos de PATAKIT, con 3 membranas de 4,5 cm (para 135 muestras) o 3 membranas de 9 cm (para 450 muestras).	87
Tabla 4.1	Resultados del contraste χ^2 para presencia de virus (PVY, PLRV y ambos) en el ensayo de 2004.	104
Tabla 4.2	Pendientes e interceptos de las rectas de regresión de los gradientes de enfermedad relacionando la incidencia de virosis con la posición de la fila y columna de las plantas cuyos tubérculos se analizaron para PVY y PLRV; el análisis se hizo utilizando el modelo lineal ^a , para los datos de las parcelas con y sin borde de maíz. Las flechas indican la dirección del gradiente.	107
Tabla 4.3	Resultado del análisis estadístico de datos de agostamiento del ensayo de 2004 mediante un Modelo Lineal General Univariante	108
Tabla 4.4	Resultado del análisis estadístico de datos de producción bruta (kg·ha ⁻¹) según un Modelo Lineal General Univariante	111

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Producción de patata de siembra (t/año) en España entre 1961 y 2010. Fuente: FAO y MAPA (Anuario de Estadística Agrario).	9
Figura 2	Estimación de la proporción de los principales gastos en la producción de patata en regadío en A Limia. Fuente: www.institutodocampo.com .	10
Figura 1.1	Patógenos analizados en el Instituto do Campo: 1. <i>Phytophthora infestans</i> , 2a y 2b. <i>Alternaria solani</i> , 3. <i>Fusarium</i> spp., 4. <i>Hemilthosporum solani</i> , 5. <i>Streptomyces scabies</i> y 6. <i>Rhizoctonia solani</i> .	33
Figura 1.2	Número de lotes de patata de las variedades más comunes en A Limia (Agria, Kennebec y Desiree) y otras minoritarias, en los 4 años de estudio (2000 a 2003).	36
Figura 1.3	Distribución porcentual de los agricultores que hacen cada uno de los tres tipos de producción en los 4 años de estudio; 1 = Siembra; 2 = Siembra + Consumo; 3 = Consumo.	36
Figura 1.4	Nº de lotes infectados de PVX en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.	37
Figura 1.5	Nº de lotes infectados de PVY en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.	38
Figura 1.6	Nº de lotes infectados de PLRV en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.	38
Figura 1.7	Media del porcentaje de infección de PVY en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según tipo de producción (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). En el año 2000 no hubo producciones tipo 1.	39
Figura 1.8	Media del porcentaje de infección de virosis total (PVY+PLRV) según tipo de producciones (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tukey-b.	40
Figura 1.9	Porcentajes medios de infección de virosis total (PVY+PLRV) para las principales variedades de estudio (Agria, Kennebec, Desiree y otras). Media de los cuatro años de estudio (2000 a 2003).	40
Figura 1.10	Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de <i>Rhizoctonia solani</i> .	41
Figura 1.11	Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de <i>Streptomyces scabies</i> .	41
Figura 1.12	Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de <i>Hemilthosporum</i>	42

solani.

Figura 1.13	Evolución del porcentaje de lotes de patatas en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de afección por golpes	43
Figura 1.14	Porcentaje de lotes a los que se recomendó sembrar, sembrar tratando, sembrar escogiendo, sembrar tratando+escogiendo o no sembrar, en los 4 años de estudio (2000 a 2003) para cada tipo de lotes (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo).	44
Figura 1.15	Pérdidas medias estimadas para los 4 años de estudio (2000 a 2003): con todos los datos (1-4, Siembra + 5, No siembra) y con la eliminación de los datos en los que se recomienda “no sembrar” (Siembra).	44
Figura 1.16	Media del porcentaje de pérdidas estimadas en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según tipo de producción (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). En el año 2000 no hubo producciones tipo 1.	45
Figura 2.1	Efecto del estado sanitario de la semilla (sin tener en cuenta virosis) en la producción bruta media de los lotes de re-empelo de Agria y Kennebec en 2008. 1: óptimo para siembra; 2: gromo en mal estado, daños leves o presencia de síntomas de micosis; 3: gromo en mal estado, daños importantes o presencia de signos de hongos. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey b.	60
Figura 2.2	Efecto del estado sanitario de la semilla (sin tener en cuenta virosis) en la producción bruta media de los lotes de re-empelo de Agria y Kennebec en 2011. 1: óptimo para siembra; 2: gromo en mal estado, daños leves o presencia de síntomas de micosis; 3: gromo en mal estado, daños importantes o presencia de signos de hongos. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey b.	60
Figura 2.3	Escala de recomendación de siembra y producción bruta media conseguida en las parcelas sembradas con los lotes correspondientes en 2008 (Agria y Kennebec). Letra diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey-b. 1: sembrar; 2: sembrar tratando; 3: sembrar escogiendo; 4: sembrar tratando y escogiendo; 5: no sembrar. En 2008 no hubo lotes de Kennebec en el grupo 3.	61
Figura 2.4	Escala de recomendación de siembra y producción bruta media conseguida en las parcelas sembradas con los lotes correspondientes en 2011 (global para Agria y Kennebec). Letra diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey-b. 1: sembrar; 2: sembrar tratando; 3: sembrar escogiendo; 4: sembrar tratando y escogiendo; 5: no sembrar.	62
Figura 2.5	Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	63
Figura 2.6	Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta / ecuación de regresión	63

	lineal (- - -).	
Figura 2.7	Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	63
Figura 2.8	Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta / ecuación de regresión lineal (- - -).	64
Figura 2.9	Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	64
Figura 2.10	Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	64
Figura 2.11	Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	65
Figura 2.12	Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	65
Figura 2.13	Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	65
Figura 2.14	Porcentaje PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	66
Figura 2.15	Porcentaje PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	66
Figura 2.16	Porcentaje PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).	66
Figura 2.17	Producción bruta y comercial ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en parcelas sembradas con lotes de Fina de Carballo con niveles ascendentes de PVY en 2009.	68
Figura 2.18	Producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) media \pm dt en parcelas sembradas con lotes de Fina de Carballo con 100% de PVY y/o PLRV en los ensayos de 2010.	68
Figura 3.1	Revelado de impresiones de muestra positiva para PVY y PLRV (a), positiva para PVY (b) y positiva para PLRV (c) y negativa para ambos (d).	79
Figura 3.2	Variación en resultados de análisis de PVY y PLRV en los tubérculos de	

	una misma planta; gráfico en base a los análisis de todos los tubérculos de 21 plantas	80
Figuras 3.3 a 3.6	Histogramas de % de coincidencia de métodos de análisis DIP/DAS-ELISA referidos a placas (3.3 y 3.4) o a lotes analizados (3.5 y 3.6), para PVY y PLRV.	82
Figura 3.7	Membranas DIP reveladas; a y b: membrana con impresiones irregulares, sucias, alteradas y/o quebradas; c y d: membranas con un número óptimo de impresiones, ordenadas, claras; e: membrana de 9 cm con un total de 240 muestras bien ordenadas aprovechando el espacio; f: membrana con impresiones de brotes de tubérculos recién brotados, ordenada pero pocas muestras por membrana.	87
Figura 4.1	Capturas en la trampa Moericke de La Laguna, próxima al ensayo de 2001. Muestreos 2 veces por semana. Flecha roja: aplicación herbicida de contacto (Diquat) para eliminación de matas.	101
Figura 4.2	Ensayo de O Corgo 2003. Porcentaje medio de PVY en planta a finales de julio de 2003 (colores claros) y en tubérculo (análisis global por planta) en enero/febrero de 2004 (colores oscuros). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,01$ (contraste χ^2).	102
Figura 4.3	Plano de localización de la finca de ensayos en el Instituto do Campo en 2004 y mapeo de infecciones tempranas. Porcentaje de plantas infectadas por PVY (análisis en hoja antes de cosecha) en las parcelas de ensayo y en cultivos de patata contiguos (ensayos de variedades y abonado). Los recuadros vacíos indican 0% de infección	103
Figura 4.4	Porcentajes de plantas con tubérculos positivos para PVY, PLRV e infección mixta. Colores distintos de borde en los bloques indican diferencias significativas ($P < 0,05$) comparados dos a dos con la prueba χ^2 . Letras distintas dentro de cada bloque indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) comparados dos a dos con una prueba χ^2 . La escala de color rojo decreciente indica los distintos niveles (%) de incidencia de cada una de las virosis analizadas	105
Figura 4.5	Porcentajes de PVY, PLRV, infecciones mixtas y total virosis en las parcelas con y sin borde de maíz en el ensayo de 2004.	106
Figura 4.6	Niveles de PVY en todas las subparcelas de cada uno de los bloques de las parcelas con o sin borde de maíz del ensayo de 2004.	106
Figura 4.7	Índice medio de contenido en clorofila (CCI) en hoja para los distintos tratamientos a lo largo del verano en el ensayo de 2004. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según Modelo Lineal General Univariante y test HSD de Tukey.	108
Figura 4.8	Mapa de las parcelas del ensayo de 2004 con los colores –verde oscuro a amarillo fuerte - asignados a la escala de agostamiento descrita en	

	Materiales y Métodos	109
Figura 4.9	Comparación del índice de agostamiento por parcela y tratamiento (0-5 de menor a mayor agostamiento) en el ensayo de 2004. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según Modelo Lineal General Univariante y test HSD de Tukey.	110
Figura 4.10	Porcentaje de PVY en los tubérculos cosechados frente a la Producción Bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en el global de las dos parcelas en el ensayo de 2004; recta/ecuación de regresión lineal. Coeficiente de Spearman $\rho = -0,305$; $p = 0,05$.	111
Figura 4.11	Producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) ($\text{media}\pm\text{dt}$) en la parcela con borde de maíz y en la rodeada de suelo desnudo en el ensayos de 2004 en la finca experimental del Instituto do Campo en A Limia.	112
Figura 4.12	Comparación de la producción media ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de patata de siembra según los tratamientos aplicados en la parcela con o sin borde de maíz en el ensayo de la finca experimental del Instituto do Campo en 2004.	112
Figura 5.1	Niveles de producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en función del nivel de virosis (0% PVY y certificada / 60-100% PVY) de los lotes de patata de reemplazo de la variedad Kennebec utilizados para siembra en 2008 y 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas entre niveles de virosis con $p < 0,05$ según el test de Tuckey-b.	130
Figura 5.2	Efecto del abonado nitrogenado en cobertera (0-75-125 uds) sobre lotes de patata de siembra Kennebec sin PVY (0% y certificada) y con valores altos de PVY (60 y 100%) en la producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en 2008 y 2009. Sólo hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las producciones de los dos años.	130
Figura 5.3	Efecto del abonado nitrogenado en cobertera (0-75-125 uds) sobre lotes de patata de siembra Kennebec sin PVY (0% y certificada) y con valores altos de PVY (60 y 100%) en el porcentaje de materia seca ($\text{media}\pm\text{dt}$) en tubérculo en 2009.	131
Figura 5.4	Producción ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) ($\text{media}\pm\text{dt}$) de lotes de patata de siembra de la variedad Fina de Carballo con 100% PVY y 0% PLRV abonadas en cobertera con 0, 100 ó 150 uds. de N, en comparación con un lote libre de virus con abonado estándar de 75 uds N en cobertera.	131

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA PATATA Y SU PROPAGACIÓN.

La patata pertenece a la familia *Solanaceae*. El género *Solanum* es muy amplio, con alrededor de 200 especies tuberosas que se agrupan en el subgénero *Potatoe* (G. Don) D'Arcy, sección *Petota* Dumort (anteriormente denominada *Tuberarium*), subsección *Potatoe* G. Don (anteriormente *Hyperbasarthurum*) (Rossignol y Rousselle-Bourgeois, 1996). Hay especies desde diploides hasta hexaploides. La especie tetraploide *Solanum tuberosum* L. es la más productiva y la más extendida. En esta especie se diferencian dos subespecies: *andigena*, con origen en Perú y Bolivia, y *tuberosa*, desarrollada como resultado de la selección bajo condiciones de día largo, en la costa de Chile y durante varios siglos en Europa.

1.1 Origen y fundamento de la producción de patata de siembra.

El cultivo de la patata se propaga a través de la denominada patata de “siembra”, “simiente” o “semilla”, aunque en realidad no se realice una verdadera siembra sino una plantación de tubérculos. Este método de propagación vegetativa de la patata por tubérculos conlleva la transmisión a la descendencia de diversos patógenos entre los que se encuentran hongos, bacterias, nematodos, virus, viroides y fitoplasmas, además de algunas plagas (Rouselle *et al.*, 1999).

Muchos de estos patógenos no inducen síntomas visibles en los tubérculos e incluso no muy aparentes en las plantas, por lo que no es posible una selección visual previa. A finales del siglo XIX las enfermedades que hoy sabemos tienen etiología viral se contemplaban como procedentes de una “modificación hereditaria” de las características de la planta que produce una “degeneración” del tubérculo. Pero no todas las plantas presentaban esa degeneración y por tanto se empieza a pensar en organizar racionalmente selección de la producción de patata para siembra libre de problemas sanitarios (Ellissèche *et al.*, 1999). Hacia 1900, los agricultores alemanes se dieron cuenta de que, además de transmitirse a las siguientes generaciones a través de tubérculos infectados, los síntomas de la degeneración de las plantas de patata se transmitían entre plantas en campo. También comprobaron que la selección de plantas

sanas y vigorosas para la obtención de tubérculos para la replantación, podía eliminar o disminuir el efecto degenerativo. El sistema alemán de producción de patata de siembra fue copiado por Estados Unidos y Canadá (Slack y Singh, 1998).

Además de la degeneración, se vio también que la entrada de patata sin controlar daba lugar a la introducción de patógenos que no existían en una zona determinada; el primer paso para evitarlo se dio en Estados Unidos con la prohibición de entrada de patata con el hongo *Synchytrium endobioticum*, mediante el Plan Nacional de Cuarentena. En 1913 Canadá y seis estados de Estados Unidos establecieron sus programas de certificación y en 1914 se crea la Asociación Americana de la Patata (Slack y Singh, 1998).

Durante la puesta en funcionamiento de los sistemas oficiales de certificación de tubérculos para siembra el sistema de selección sufrió una evolución notable a medida que se iba conociendo tanto el origen de la degeneración como los sistemas de transmisión de enfermedades y los métodos para diagnosticarlas (Shepard y Clafin, 1975). Inicialmente, la selección se hacía en pleno campo y consistía en elegir las matas aparentemente sanas, marcarlas por medio de una estaquilla (controladores) y cosechar aparte sus tubérculos para destinarlos a replantación. Esos tubérculos “seleccionados” se multiplicaban en una zona apropiada, donde la degeneración aparentemente no se manifestara. El inconveniente de este sistema de selección es que sólo se detectan infecciones tempranas. Hacia los años 1950 se consigue, mediante la utilización de rindita, eliminar el letargo que impide brotar a los tubérculos recién cosechados y se puede proceder al “pre-cultivo” de una muestra representativa a final de verano y observar los síntomas para descartar plantas infectadas mucho antes.

Además de la mejora de los métodos de selección de tubérculos, se ponen también a punto técnicas que permiten la producción más segura de patata certificada, entre ellas la aplicación de insecticidas y/o aceites que limitan la transmisión de los virus por sus vectores (Ellisèche *et al.*, 1999).

Pero lo que revoluciona definitivamente el sistema de certificación es el uso de técnicas indirectas de diagnóstico, sobre todo las inmunoenzimáticas. En 1977, Clark y Adams publican el protocolo base de la técnica DAS-ELISA (“Double antibody sandwich – Enzyme linked immunosorbent assay”) y a principios de los años 80 se pone a punto el análisis de tubérculo brotado con este método serológico, sensible y

fiable, que permite analizar muchas muestras en poco tiempo y espacio, a un precio que puede ser competitivo, cuando se evalúan grandes cantidades de tubérculos y que, además, se puede automatizar (Bokx y Maat, 1979; Clarke *et al.*, 1980). En la actualidad existen anticuerpos comerciales para prácticamente todos los virus de patata con importancia económica y este método es la técnica oficial de análisis en países de todo el mundo. Surgen muchas variantes del ELISA, incluso sistemas para muestras individuales que pueden tener interés en campo para evaluar con rapidez (en varios minutos) plantas control (SpotCheck® de ADGEN o Pocket Diagnostics de Forsite Diagnostics Limited, por ejemplo). Con el objetivo de que las técnicas serológicas puedan aplicarse en circunstancias en las que no es fácil disponer de la infraestructura necesaria para el DAS-ELISA, se ponen a punto en la década de 1990 métodos que evitan el triturado de muestras y presentan ciertas ventajas como son la posibilidad de impresión de cortes en campo, mayor rapidez y menor precio que el método oficial (Cambra *et al.*, 1994; Guzmán *et al.*, 2002).

A partir de 1990 se empiezan a diseñar métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos (cDNA, RT-PCR, Taq-Man, NASH) que son muy sensibles y específicos y que van sustituyendo a los serológicos como método de diagnóstico (Barker *et al.* 1993; Balme *et al.*, 2006; Rolland *et al.*, 2008) aunque todavía, a gran escala, presentan problemas diversos (Martin *et al.*, 2000). Son imprescindibles para diagnosticar razas de algunos virus, como la NTN del PVY (Schubert *et al.*, 2007; Mallik *et al.*, 2012). Técnicas como PC-RT-PCR (Print capture – reverse transcriptasa-PCR) podrían sustituir a las técnicas de inmunoimpresión directa (Cambra *et al.*, 2000; Gawande *et al.*, 2011).

En algunos casos, sobre todo en variedades ya antiguas, el material para seleccionar llega a no ser válido y/o rentable para su multiplicación; dado que la mayoría de los virus no infectan ni la semilla botánica ni los ápices meristemáticos, la regeneración a partir de éstos o la termoterapia y cultivo de ápices, permite obtener y cultivar *in vitro* los clones saneados (Ellisèche *et al.*, 1999). La asociación de termoterapia, cultivo de meristemas y propagación *in vitro* para obtener microtubérculos, ha permitido regenerar la mayor parte de las variedades antes infectadas crónicamente frente a diferentes virus (Belle de Fontenay, Bintje, BF 15, etc.). Hay virus más difíciles de eliminar que otros, en orden creciente de dificultad de eliminación estarían PLRV, PVA, PVY, PVM, PVS y PVX (Ellisèche *et al.*, 1999). La

propagación inicial de estos microtubérculos producidos *in vitro* también ha evolucionado mucho siendo los sistemas “aeropónicos” una de las últimas y más prometedoras técnicas para la producción de minitubérculos en invernadero (Farran y Mingo-Castel, 2006). En algunos países, para variedades de uso industrial a nivel mundial, también se está utilizando el cultivo de semilla botánica, siempre libre de virus, como material de partida para producir tubérculos para siembra; se hace, especialmente, en países en vías de desarrollo por la reducción de los costes y los problemas del transporte de material de reproducción vegetativa voluminoso y pesado (Almekinders *et al.*, 2009).

1.2 Producción de patata de siembra en España

La utilización de patata de siembra de origen más o menos controlado se inicia en España en los años 20, como una absoluta necesidad ante la evidencia de “degeneración” que conducía a unos rendimientos muy bajos. Así, en 1933 se crea la Estación de Mejora del Cultivo de la Patata del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias que se sitúa en Vitoria (Álava). Entre sus objetivos estaban el establecimiento de las zonas idóneas para la obtención de la patata de siembra y la organización y control de la producción (Mateo Box, 1999). La Estación conservó la función de investigación y asignó la de control de la producción al Servicio Nacional de la Patata de Siembra, creado en 1941. En 1947 se fundó el Instituto Nacional de Semillas Selectas que abarcó al anterior. Las necesidades de la producción nacional obligaron a la creación, en 1971, del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. En el caso de la patata de siembra, los objetivos fundamentales del INSPV eran la vigilancia y el control de la calidad sanitaria, el vigor fisiológico y la autenticidad varietal (Mateo Box, 1999).

La normativa básica que regula la producción de patata de siembra en España es el Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra (Orden de 24 de mayo de 1989) con las modificaciones previstas en las Órdenes de 16 de julio de 1990, 10 de octubre de 1994, 11 de abril de 1995 y 3 de marzo de 1998. El último texto disponible se ajusta a la Directiva 93/17/CEE del Consejo de 30 de marzo relativa a la definición de clases comunitarias de patata de siembra de base y sus modificaciones y con el Real Decreto 323/2000 de 3 de marzo (Tabla 1).

Tabla 1 Normativa relacionada con la producción de patata de siembra certificada: Reglamento Técnico de Control y Certificación de Patata de siembra.

Orden	BOE
<i>24 de Mayo de 1989</i>	<i>6 de Junio de 1989</i>
<i>16 de Julio de 1990</i>	<i>4 de Agosto de 1990</i>
<i>10 de Octubre de 1994</i>	<i>14 de Octubre de 1994</i>
<i>11 de Abril de 1995</i>	<i>21 de Abril de 1995</i>
<i>18 de Julio de 1997</i>	<i>26 de Julio de 1997</i>
<i>3 de Marzo de 1998</i>	<i>12 de Marzo de 1998</i>
<i>Real Decreto 323/2000, de 3 de Marzo</i>	<i>4 de Marzo de 2000</i>

Tabla 2 Patógenos transmitidos por el tubérculo cuya valoración contempla el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Patata de siembra.

Patógeno	Clasificación	Normativa
<i>PVX</i>	Potexvirus	-
<i>PVY</i>	Potyvirus	Si*
<i>PLRV</i>	Luteovirus	Si*
<i>Rhizoctonia solani</i>	Hongo	si
<i>Streptomyces scabies</i>	bacteria	Si
<i>Hemilthosporum solani</i>	Hongo	-
<i>Phytophthora infestans</i>	Oomyceto	**
<i>Alternaria solani</i>	Hongo	**
<i>Fusarium solani</i>	Hongo	**
<i>Phoma exigua</i>	Hongo	**
<i>Erwinia carotovora</i>	bacteria	**

*suma de todos los virus presentes **incluidas dentro de “podredumbres secas y húmedas”

La localización de la producción de la patata de siembra en España se ha centrado tradicionalmente en las provincias de Álava, Burgos, Palencia y Navarra y en menor proporción en las de Soria, Segovia, Cantabria, Lugo, A Coruña, Granada y Jaén (Mateo Box, 1999). El número de entidades productoras ha disminuído considerablemente en la última década. En 2012 solo figuran en la página web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 28 entidades: 17 en Castilla-León, 7 en el País Vasco, 2 en Galicia, 1 en Canarias y 1 en Navarra. En la campaña 2010/11 se produjeron un total de

37.186 t en 2.685 ha. En la actualidad las funciones de control y certificación de semillas y plantas de vivero se han transferido a las autonomías. El control que se lleva a cabo se refiere fundamentalmente a la comprobación del estado sanitario de los tubérculos de siembra de acuerdo con la normativa en vigor (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 3 Patógenos de cuarentena de los que debe estar libre el tubérculo de siembra y los terrenos en los que se produce.

Patógeno	Clasificación	Normativa*	EPPO
<i>'Ca. Phytoplasma solani' (Stolbur)</i>	Fitoplasma		A2
<i>Clavibacter michiganensis sepedonicus</i>	Bacteria	93/85/EEC	A2
<i>Epitrix similis</i>	Coleoptero		A2
<i>Epitrix tuberis</i>	Coleoptero		A1
Globodera spp	Nematodos	2007/33/CE	A2
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptero		A2
<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Nematodos		A2
<i>Meloidogyne fallax</i>	Nematodos		A2
<i>Potato black ringspot virus</i>	Nepovirus		A1
<i>Potato purple-top wilt</i>	Fitoplasma		A1
<i>Potato virus T</i>	Trichovirus		A1
<i>Potato yellow dwarf virus</i>	Nucleorhabdovirus		A1
<i>Potato yellow vein virus</i>	Crinivirus		A1
<i>Potato yellowing virus</i>	Alfamovirus		A1
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	Viroide		A1
Ralstonia solanacearum	Bacteria	98/57/EC	A2
Synchytrium endobioticum	Hongo	69/464/CEE	A2
<i>Tuta absoluta</i>	Lepidoptero		A2

* Directiva específica; Fuente: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/>

Tras un par de décadas de descenso de producción de patata de siembra en España, ésta se ha recuperado algo pero en la actualidad no llega a las 40.000 t (Fig. 1). Los productores de patata españoles cada vez recurren en mayor medida al uso de patata de siembra certificada y con el Pasaporte Fitosanitario oficial que exige la Unión Europea de ahí que se estime que las necesidades de patata de siembra españolas superan las 150.000 t, más del triple de la producción nacional; para cubrir esas necesidades se importan cantidades importantes de patata de siembra desde Holanda, Dinamarca, Bélgica, Francia y Gran Bretaña.

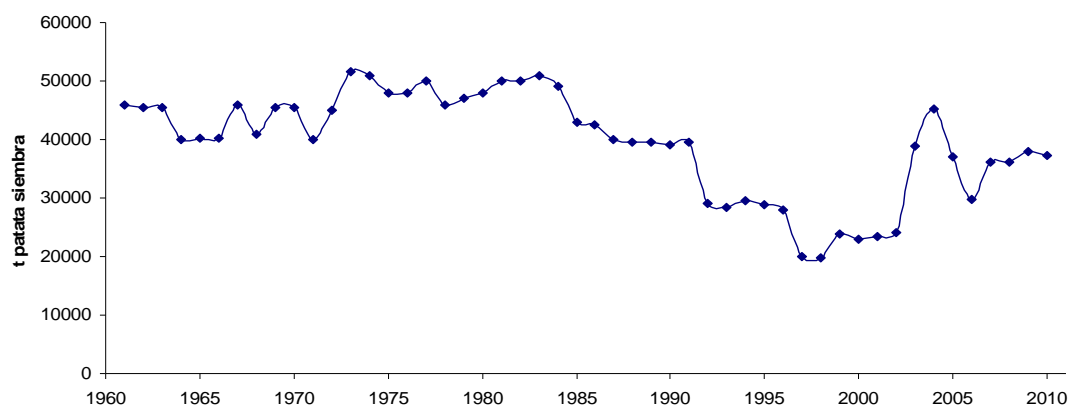


Figura 1. Producción de patata de siembra (t/año) en España entre 1961 y 2010. Fuente: FAO y MAPA (Anuario de Estadística Agrario).

1.3 Producción de patata y patata de siembra en Galicia

Aunque se cita que las primeras patatas se sembraron en 1576 en el convento de Herbón (Rodríguez-Galdo y Dopico, 1980), el cultivo como tal se menciona desde el año 1607, alcanzando realmente su importancia y dimensión social a mediados del siglo XVIII (1736) con los primeros pleitos entre labradores y perceptores de diezmos. Su expansión más importante se produce a raíz de la crisis cerealista de 1768-69 y en ese momento se convierte, al igual que en otras zonas de Europa, en la base del desarrollo demográfico. Desde finales del siglo XVIII el cultivo de patatas es uno de los rasgos más destacados del paisaje agrario gallego (Rodríguez-Galdo y Dopico, 1980).

Galicia es en la actualidad una de las comunidades autónomas con mayor producción de patata detrás de Castilla y León y Andalucía, con un 15% de la producción con respecto al total pero, al menos en 2000, un 47% de la producción de patata se dedicaba al autoconsumo y reemplazo y ese porcentaje, con variaciones, se mantiene (http://www.xunta.es/galicia2003/es/T_07.htm). En la Tabla 4 se puede ver que en Galicia hay una cierta estabilidad en superficie y producción en los años de estudio entre 2000 y 2011.

Tabla 4. Superficie (ha) y producción (t) de patata de consumo en Galicia del 2000 al 2011.

Año	Superficie (ha)	Producción (t)
2000	21.499	474.353
2001	22.413	462.781
2002	22.587	514.345
2003	21.731	513.646
2004	21.506	489.827
2005	20.829	453.214
2006	18.859	424.444
2007	19.013	370.654
2008	17.091	295.651
2009	19.944	487.708
2010	18.627	454.148
2011	19.468	369.126

Fuentes: <http://www.mapya.es> y <http://mediorural.xunta.es/institucional/estadisticas/>

En una estimación de los gastos de producción del cultivo de patata en regadío en A Limia realizada en 2000 (Fig. 2) se observa que los gastos en semilla constituyen el 29% del total, siendo éste el gasto más alto de la producción.

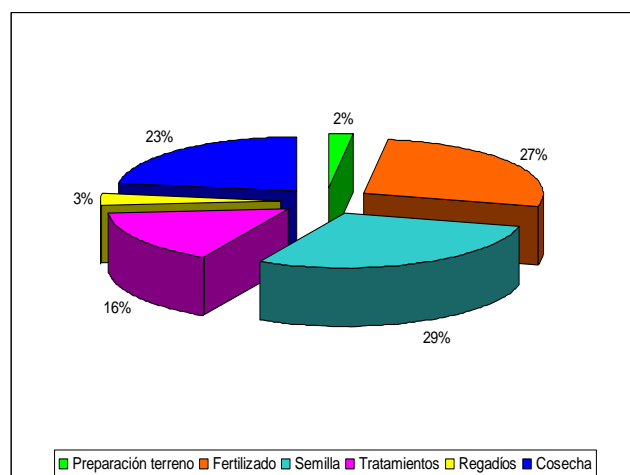


Figura 2. Estimación de la proporción de los principales gastos en la producción de patata en regadío en A Limia.
Fuente: www.institutodocampo.com.

Destacan tres zonas de cultivo de patata en Galicia, no sólo por su producción para consumo y autoconsumo (mayoritaria en algunas de ellas), sino porque hubo una época en que fueron productoras de “Patata de Siembra Certificada”: A Terra Cha, Bergantiños y A Limia (Tabla 5). Tras la detección de nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) en A Limia, la producción de patata de siembra desaparece.

Tabla 5. Serie histórica (1966-1980) de producción de patata de siembra certificada “B” precintada en Galicia.

CAMPAÑA	66/67	67/68	68/69	69/70	70/71	71/72	72/73	73/74	74/75	75/76	76/77	77/78	78/79	79/80
AGA (Ourense)	1.840	1.670	1.730	2.820	1.620	1.270	720	860	-	-	-	-	-	-
PROPASI (Ourense)	1.700	1400	1.120	1.800	1.180	1.430	900	1.000	1.940	1.640	1.700	1.750	740	-
SEMISA (Lugo)	3.090	3.930	2.950	2.930	3.130	2.660	3.680	3.330	2.750	2.680	2.730	2.270	1.270	1.480
SEYCO (A Coruña)	-	-	-	-	-	-	-	-	910	960	970	1.400	770	540
S.P.S. (Ourense)	30	20	30	40	20	10	20	10	-	-	-	-	-	-
S.P.S. (A Coruña)	-	-	-	310	1.260	800	570	560	-	-	-	-	-	-
CajaAhorros (Ourense)	340	680	270	380	640	490	460	400	480	410	-	-	-	-
Total Galicia	7.000	7.700	6.100	8.280	7.850	6.660	5.890	6.160	6.080	5.690	5.400	5.420	2.780	2.020
% Gal/Esp	12,72	10,39	11,34	10,46	11,48	10,26	7,38	7,44	6,90	7,86	4,94	7,60	3,39	1,90

Fuente: Julio Gómez (IXP Patata de Galicia).

Según Fernández-Nogueira, (2003) en el año 1969, el ayuntamiento de Coristanco fue propuesto por el Instituto Nacional de Semillas por sus condiciones climatológicas y edafológicas para el cultivo de patata de siembra certificada, como "zona marítima" similar a otras zonas europeas y de Canadá. Tras los ensayos realizados por el INSPV sobre la sanidad de semilla producida, la zona pasó a ser explotada comercialmente durante ocho años por una empresa privada. Posteriormente los agricultores se constituyeron la sociedad cooperativa: "Productores Asociados de Patata de Bergantiños" (COPABER) que funcionó desde 1980 hasta la campaña 1992/93.

En el año 2002 se inician ensayos por parte de la empresa Sementes de Galicia S.L., para producir patata de siembra certificada en la provincia de Ourense en los ayuntamientos de Castro Caldelas, Calvos de Randín, Viana do Bolo y A Veiga, llegando a producir, en 2004, cerca de 229 t de patata de siembra de la variedad Kennebec y menores cantidades de otras variedades como Agria y también Fina de Carballo.

2. VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE LA PATATA.

Los virus vegetales son los principales agentes infecciosos que afectan a la patata. Aparentemente la patata fue la primera herbácea en la que se encontraron síntomas que apuntaban a una infección viral y eso ocurrió poco después de su introducción en Europa antes de 1570 (Salazar, 2003) pero no se empezó a tener en cuenta hasta el siglo XIX cuando empezaron a peligrar las producciones en Alemania e Inglaterra. La degeneración se atribuía a cambios fisiológicos debidos a la multiplicación vegetativa repetida. Con la información disponible era imposible diagnosticar el agente causante de la enfermedad; el descubrimiento de la primera enfermedad de la patata causada por un virus marcó el principio de la investigación de virus como agentes causantes de enfermedades (Sutic *et al.*, 1999).

Tabla 6. Distribución y transmisión de virus que infectan a *Solanum tuberosum*.

Virus	Acrónimo	Género	Distribución geográfica	Vector	Modo de transmisión
<i>Potato virus A</i>	PVA	<i>Potyvirus</i>	Mundial	Pulgones	No persistente
<i>Potato virus V</i>	PVV	<i>Potyvirus</i>	Europa y América	Pulgones	No persistente
<i>Potato virus Y</i>	PVY	<i>Potyvirus</i>	Mundial	Pulgones	No persistente
<i>Henbane mosaic virus</i>	HeMV	<i>Potyvirus</i>	Europa	Pulgones	No persistente
<i>Potato virus X</i>	PVX	<i>Potexvirus</i>	Mundial	Hongos	Mecánica y contacto
<i>Potato leaf roll virus</i>	PLRV	<i>Luteovirus</i>	Mundial	Pulgones	Persistente
<i>Potato virus M</i>	PVM	<i>Carlavirus</i>	Mundial	Pulgones	No persistente
<i>Potato virus S</i>	PVS	<i>Carlavirus</i>	Mundial	Pulgones	No persistente, contacto
<i>Potato virus T</i>	PVT	<i>Capillovirus</i>	América del Sur	-	Tubérculos infectados
<i>Andean potato mottle virus</i>	APMV	<i>Comovirus</i>	Perú, Bolivia	Escarabajos	Contacto
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>	Inglaterra, Escocia	Pulgones	No persistente
<i>Potato mop-top virus</i>	PMTV	<i>Furovirus</i>	América N y S y CEuropa	Hongos	Esporas fúngicas
<i>Alfalfa mosaic virus</i>	AMV		Mundial	Pulgones	No persistente
<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	<i>Nepovirus</i>	Norte y CEuropa	Nematodos	-
<i>Potato black ring spot virus</i>	PBRV	<i>Nepovirus</i>	Región andina	Nematodos	-
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	<i>Tobravirus</i>	Europa, Asia y América	Nematodos	-
<i>Beet curly top virus</i>	BCTV	<i>Geminivirus</i>	Utah	Saltamontes	Circulativa
<i>Solanum apical leaf curl virus</i>	SALCV	<i>Geminivirus</i>	Andes, India	Saltamontes	Circulativa
<i>Potato yellow dwarf virus</i>	PYDV	<i>Rhabdovirus</i>	Canadá, USA	Saltamontes	Circulativa
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	<i>Tobamovirus</i>	Mundial	Hongos	Contaminación
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>Necrovirus</i>	Holanda, Italia	Hongos	Contaminación
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<i>Tospovirus</i>	Mundial	Thrips	Propagativa
<i>Tobacco streak virus</i>	TSV	<i>Ilarvirus</i>	Europa	Thrips	Propagativa
<i>Andean potato latent virus</i>	APLV	<i>Tymovirus</i>	Región andina	Escarabajos	Contacto
<i>Arracacha virus B</i>	AVB	-	Perú	-	Tubérculos infectados
<i>Egg plant mottled dwarf virus</i>	EMDV	<i>Rhabdovirus</i>	Irán	-	Tubérculos infectados
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	PAMV	-	Mundial	-	Tubérculos infectados
<i>Potato yellow vein virus</i>	PYVV	^a	Región andina	-	Tubérculos infectados
<i>Potato deforming mosaic virus</i>	PDMV	^a	Región andina	-	Tubérculos infectados

Fuente: Mih y Atiri, 2005

La primera mención a la causa que provocaba el enrollamiento de las hojas y que causaba grandes daños la realizó Appel en 1905 (Bagnall, 1988). Los datos de esas investigaciones contribuyeron a la determinación de la naturaleza viral de la degeneración que se venía produciendo desde muchos años atrás (Salazar, 2003). Las patatas pueden ser infectadas por muchos virus diferentes que pueden reducir la calidad de tubérculo y la producción. En 1971 se habían contabilizado 33 virus y fitoplasmas que afectaban a la patata y Salazar hace una revisión en 1996 que actualiza en 2003 (Salazar, 2003). En 2005, Mih y Atiri describen los mas importantes (Tabla 6). En Europa hay 22 especies patógenas de las cuales sólo 10 causan graves pérdidas económicas (Sutic *et al.*, 1999).

Los virus en patata reducen el vigor de las plantas y la posibilidad de utilizar los tubérculos como semilla porque se perpetúan en los tubérculos; las plantas de patata pueden ser portadoras de virus sin presentar síntomas (Alonso, 2002). En muchos casos, los síntomas de distintos virus son similares y consisten en mosaicos sobre las hojas, atrofia de la planta y malformaciones tanto de hojas como de tubérculos. Los síntomas no siempre son expresados debido a interacciones entre el virus, la planta de patata, las condiciones de cultivo (fertilidad del suelo), las condiciones ambientales, o la edad de la planta cuando es infectada. Los tubérculos infectados dan lugar a plantas con una expresión de síntomas más clara que cuando lo adquieren durante el cultivo.

Los principales vectores de transmisión de virus en el cultivo de patata son los pulgones (Homoptera: aphididae). Uno de los pulgones más comunes encontrados sobre la patata, el pulgón verde del melocotón (*Myzus persicae*), transmite más de 100 virus a muchas plantas diferentes. *M. persicae*, en regiones templadas, pasa el invierno en plantas leñosas (como melocotoneros) y el verano sobre plantas no leñosas, como la patata, formando colonias. *M. persicae* es el vector de virus más eficiente (Harrison, 1984). Para la transmisión de virus no persistentes un pulgón no necesariamente tiene que ser plaga de la patata, basta con tiempos muy cortos de cata para el paso de los virus. Otras vías de propagación, aunque solo de algunos virus, son medios mecánicos mediante el troceo de semilla, la maquinaria e incluso la propia fricción normal de unas plantas contra otras en campo (Alonso, 2002).

Algunos virus afectan a la producción más que otros por lo que es importante determinar cuál es el virus que afecta a la patata porque los métodos de control varían en función del virus y su forma de transmisión. Salazar, en 2003, hace una clasificación

de 5 niveles de importancia de los principales virus de la patata en función de su efecto en el rendimiento, análisis de riesgo y distribución; PVY y PLRV aparecen en el primer nivel, con pérdidas potenciales de producción de hasta el 90%, distribución mundial y riesgo alto.

2.1 *Potato virus Y (PVY)*

El **PVY** es el virus tipo del genero *Potyvirus* incluido en la familia *Potyviridae*. Los síntomas de ésta enfermedad varían mucho en función de la raza de PVY de que se trate y de la variedad de patata: desde clorosis muy suave hasta necrosis severas y muerte de la planta afectada y daños en el tubérculo. La reducción de la producción en variedades sensibles puede ser de más del 50% (Spaar y Hamann, 1977) pero casi todas las variedades modernas tienen buenos niveles de resistencia y se siguen incorporando genes que dan una resistencia extrema (Mendoza *et al.*, 1989; Dalla Rizza *et al.*, 2006).

Las razas del PVY se han clasificado en tres grupos básicos basándose en los síntomas característicos en la patata, el tabaco y en *Physalis floridana* (Sutic *et al.*, 1999): PVY⁰ (raza común); PVY^c; PVY^N (raza necrótica). Además, hay razas híbridas combinación de otras como PVY^{N0} y PVY^{NTN}. Las infecciones primarias de PVY⁰ no causan síntomas de importancia, sobre todo si la transmisión por pulgones es tardía. Las infecciones secundarias de PVY⁰ dan lugar a plantas más pequeñas de lo normal, hojas rugosas, con mosaicos, moteadas y acartonadas y a veces necrosis en el follaje y tallos (Smith *et al.*, 1992). El mosaico en las hojas puede ser enmascarado cuando se produce a altas temperaturas o cuando el abonado nitrogenado ha sido muy fuerte, pero la enfermedad se puede identificar por la rugosidad de la superficie y bordes de las hojas (Sutic *et al.*, 1999). Los nervios del envés de las hojas más bajas de la planta afectada suelen presentar zonas necróticas que parecen líneas negras. Las plantas afectadas están como atrofiadas y mueren prematuramente. En los tubérculos, el único síntoma es la reducción de su tamaño debido a los daños sufridos por la vegetación (Sutic *et al.*, 1999). En los últimos años se está extendiendo cada vez más la raza PVY^{NTN}, que algunos autores consideran un nuevo virus; fue identificada por primera vez en Eslovenia (Le Romancer *et al.* 1994)). Además de los síntomas típicos del PVY sobre la vegetación, en el tubérculo al principio aparecen unos anillos circulares de color marrón que sobresalen sobre la piel del tubérculo, sobre todo en la zona de las yemas;

posteriormente estas zonas se deprimen al morir las células que las forman y a medida que van muriendo células hacia el interior del tubérculo, se va acentuando la depresión y el tejido muerto va tomando apariencia corchosa, llegando a producirse grietas al romperse la piel (Alonso, 2002).

La transmisión de PVY y de otros potyvirus, como el PVA, se realiza con ayuda de un coadyudante presente en la savia de la planta infectada (Thornbury y Pirone, 1983). Este virus es llevado en el estilete de los pulgones y transmitido en pocos segundos en forma no persistente, es decir, el pulgón después de entre 2 y 7 horas de ayuno tarda en adquirir el virus de una planta enferma entre 0,5 y 5 minutos y lo va transmitiendo a plantas sanas, permaneciendo infectivos entre 1 minuto y 1 hora (Spaar y Hamann, 1977; Martínez-García *et al.*, 2001). *Aphis nasturtii*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphoninus latysiphon*, se encuentran entre sus vectores más importantes (Tabla 7).

Tabla 7. Principales vectores de PVY y PLRV en patata.

Pulgón	Virus transmitido	
	PLRV	PVY
<i>Aphis nasturtii</i>	+	+
<i>Aulacorthum solani</i>	+	-/+
<i>Macrosiphom euphorbiae</i>	+	-/+
<i>Myzus persicae</i>	+	+
<i>Rhopalosiphoninus latysiphon</i>	+	+

El PVY en combinación con el PVX tiene una reacción sinérgica que causa síntomas muy fuertes, y dañan particularmente la producción (Sutic, *et al.*, 1999).

Para evitar la transmisión de virus no persistentes, como el PVY y otros muchos, está especialmente recomendada la producción de patata de siembra en regiones altas (montaña) donde las condiciones ambientales no son favorables para el desarrollo del vector y no se produce patata para consumo. También está bien documentado que el uso de aceites de distintos orígenes puede reducir la transmisión de virus no persistentes

(Bradley *et al.*, 1962; Simons y Zitter, 1980; Ioannou y Iordanou, 1987; Bell, 1989; Legorburu, 2000; Martín-López *et al.*, 2006) y que los cultivos borde actúan como barrera y como trampa (Difonzo *et al.*, 1996; Marnotes, 2005). Se sabe que también que los acolchados pueden actuar como repelentes de vectores (Döring y Saucke, 2002). Los productos relacionados con la inducción de resistencia sistémica adquirida (SAR) parecen prometedores en la producción de patata de siembra pero tras las primeras pruebas no se ha registrado ninguno para este cultivo en España. El PVY supone un gran problema en la producción de patata de siembra, superior en los últimos años al PLRV que se controla mejor con insecticidas.

2.2 *Potato leafroll virus (PLRV)*

El virus del enrollado de la patata pertenece al género *Luteovirus*, en la familia *Luteoviridae* y es una de las enfermedades de etiología viral más serias que afectan al cultivo de la patata; ampliamente distribuido, es responsable de importantes reducciones en el rendimiento (hasta un 80% de la producción de una planta normal, en variedades sensibles) (Smith *et al.*, 1992; Alonso, 2002).

Se multiplica y está restringido a las células de los tejidos del floema (Harrison, 1984). La necrosis del floema ocurre en tallos y tubérculos de plantas infectadas lo que impide el movimiento normal de los carbohidratos asimilados que se acumulan en las hojas causando el enrollamiento de las mismas.

Los síntomas iniciales se presentan en las hojas jóvenes, las cuales se muestran erectas, enrolladas y con enrojecimientos o clorosis en los bordes. Los síntomas de la infección primaria son más pronunciados en la zona apical (hojas) y se caracterizan por su rigidez, descenso y cambio del color (las hojas se enrollan y se vuelven azuladas o rojizas en la base dependiendo del cultivar). Los síntomas son más pronunciados en caso de infecciones tempranas, pero no producen enanismo y pueden no manifestarse en el caso de infecciones tardías (Smith *et al.*, 1992; Sutic, *et al.*, 1999; Alonso, 2002). Las plantas con infecciones secundarias (cuando la planta se origina a partir de un tubérculo infectado) presentan los folíolos inferiores enrollados y las hojas superiores con síntomas de clorosis. Normalmente las hojas se ponen rígidas y coriáceas y crujen si se frota con la mano. Cuando las plantas crecen, el enrollado se extiende a las hojas de la parte superior y suelen afectar a la planta completa. Cuando el ataque es fuerte, al cortar

el tubérculo puede apreciarse a simple vista una necrosis reticulada interna que depende de la variedad de la que se trate (Alonso, 2002).

El PLRV puede ser transmitido por tubérculos enfermos y por pulgones de manera persistente - circulativa. Al ser un virus persistente necesita un período de incubación dentro del pulgón y éste será infectivo después de la muda. Los pulgones que transmiten el PLRV requieren entre 48 y 72 horas para transmitirlo (Spaar y Hammann, 1977). Adquieren el virus tras 12 a 14 horas de alimentación. Durante otras 12-24 horas el virus se mueve a través del canal intestinal hasta las glándulas salivares y tarda entre 12-14 horas en ser capaz de infectar plantas sanas. Los áfidos colonizadores son los vectores más importantes para este virus porque la transmisión requiere un período de alimentación amplio. Entre sus vectores más importantes, además de los citados como transmisores del PVY, se encuentran *Aulacorthum solani*, y *Macrosiphom euphorbiae* (Tabla 7).

Ya que la extensión del virus del enrollado necesita más tiempo que en el caso del PVY, el factor más importante en la prevención de la infección primaria es la completa protección del cultivo durante los primeros vuelos de los pulgones. El uso de insecticidas puede ser eficaz si las poblaciones de pulgones son controladas adecuadamente (Were *et al*, 2003). La eliminación de plantas infectadas (“rogging”) ayuda a prevenir la extensión de PLRV y la cosecha temprana o la destrucción precoz de matas puede ayudar a prevenir las infecciones de final de temporada. El manejo de plantas no extenderá el virus, ya que PLRV no es transmisible mecánicamente. El control de la infección secundaria sólo se consigue usando material libre de virus (Slack y Singh, 1998).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Almekinders, C. J. M., Chujoy, E. y Thiele, G. 2009. The Use of True Potato Seed as Pro-poor Technology: The Efforts of an International Agricultural Research Institute to Innovating Potato Production. *Potato Research* 52(4): 275-293.
- Alonso, F. 2002. El cultivo de la patata, 2nd ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Bagnall, R.H. 1988. Epidemics of potato leaf roll in North America and Europe linked to drought and sunspot cycles. *Canadian Journal Plant Pathology*. 10: 193-202.
- Balme-Sinibaldi, V., Tribodet, M., Croizat, F., Lefeuvre, P., Kerlan, C., y Jacquot, E. 2006. Improvement of Potato virus Y (PVY) detection and quantitation using PVY(N)- and PVY(O)-specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* 134(1-2): 261-266.
- Barker, K., Webster, D. y Reavy, B. 1993. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Research* 36(1): 13-20.
- Bell, A.C. 1989. Use of oil and pyrethroid sprays to inhibit the spread of PVYⁿ in field. *Crop Protection* 8: 37-39.
- Bokx, J.A. y Maat, D.Z. 1979. Detection of potato virus Y in tubers with the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Med. Fac. Landbouww Rijksuniv.Gent* 44(2): 635-644.
- Bradley, R.H.E., Wade, C.V., y Wood, F.A. 1962. Aphid transsmision of potato virus Y inhibited by oils. *Virology* 18: 327-328.
- Beczner, L., Horvath, J., Romhanyi, I. y Forster, H. 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27: 339-351.
- Cambra, M. Camarasa, E., Gorris, M.T., Roman, M.P., Asensio, M. y Pérez, E. 1994. Detección de proteínas estructurales de virus mediante inmunoimpresión-ELISA y su uso en diagnóstico. *Investigaciones Agrarias; Fuera de serie* nº 2: 221-230.
- Cambra, M. Olmos, A. Gorris, M.T., Marroquín, C., Esteban, O., Garnsey, S.M., Llauger, R., Batista, L., Peña, I., y Hermoso de Mendoza, A. 2000. Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissue and single aphids. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, y R.K. Yokomi (eds.). *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*: 42-49.

- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Clarke, R.G., Converse, R.H. y Kojima, M. 1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect PLRV in potato tubers and viruliferous aphids. *Plant Disease* 64: 43-45.
- Dalla Rizza, M., Vilaró, F.L., Torres, D.G. y Maeso, D. 2006. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the uruguayan breeding program. *American Journal of Potato Research*, 83(4): 297-304.
- Döring, T.F. y Saucke, H. 2002. Potato virus Y management strategies in organic seed potatoes. 8th International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben (Germany) 12-17 May.
- Ellisèche, D., Merlet, J., Le Hingrat, Y., Groau, G. y Langlade, P. 1999. Producción de patata de siembra. En: Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (Eds.). *La Patata*. Mundi Prensa, Madrid. 423-456.
- Farran, I., y Mingo-Castel, A.M. 2006. Potato minituber production using aeroponics: effects of plant density and harvesting intervals. *American Journal of Potato Research* 83:47-53.
- Fernández-Nogueira, J. 2003. La patata, breve introducción a su historia y descripción. Consultado el 9/04/2012 URL: http://www.elgrelo.com/52/52_03.htm.
- Gawande, A., Shukla, S.J., Chimote, V.P., Kaushal, N., Kaundal, P., Garg, I.D., y Chimote, K.P. 2011. Development of PCR-based techniques for the detection of immobilised PVY virions. *Journal of Plant Pathology* 93 (1): 127-132.
- Guzmán, M., Caro, M. y García, Y. 2002. Técnica de Inmunoimpresión en membranas de nitrocelulosa. Una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PVX, PVY, PVS y PLRV que infectan a la papa (*Solanum spp.*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(2): 45-51.
- Harrison, B.D. 1984. Potato leafroll virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 291. 6 pp.
- Ioannou, N. y Iordanou, N. 1987. Prevention of the spread of Potato Virus Y in seed potatoes by mineral-oil sprays. Agricultural Research Institute. Ministry of Agriculture and natural resources. Nicosia, Cyprus. Technical Bulletin 98.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. y Nedellec M. 1994. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology* 43: 138-144.

- Legorburu, F.J. 2000. Epidemiología y control del PVY. Congreso EAPR. 473-475.
- Martínez-García, B., Llave, C., Atencio, F.A., Díaz-Ruiz, J.R., y López-Abella, D. 2001. La transmisión de los potyvirus por pulgones (Revisión). *Investigaciones Agrarias, Producción y Protección Vegetal* 16 (2): 149-167.
- Mallik, I., Anderson N.R., y Gudmestad, N.C. 2012. Detection and differentiation of Potato Virus Y strains from potato using Immunocapture Multiplex RT-PCR. *American Journal of Potato Research*. 89(3): 184-191.
- Marnotes, S. 2005. Estrategias de control de virosis en la producción de patata de siembra. Proyecto fin de Carrera Ingeniero Agrónomo. Departamento de Producción Vegetal. Escuela Politécnica superior. Universidad de Santiago de Compostela.
- Martin, R.R., James, D. y André L'évesque, C. 2000. Impacts of molecular diagnostic on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38:207-39.
- Martín-López, G., Varela I., Marnotes, S. y Cabaleiro, C. 2006. Use of various oils combined with low doses of insecticides for the control of *Myzus persicae* and PVY epidemics. *Pest Management Science* 62: 372-378.
- Mateo-Box, J.M. 1999. La patata en España. En: La patata. Rouselle P., Robert Y. y Crosnier J.C. Ed. Mundi Prensa. Madrid. 586- 597.
- Mendoza, H.A., Fernandez, E., Jayasinghe, U., Salazar, L.F., Chuquillanqui, C. y Galvez, R. 1989. Breeding for resistance to potato viruses Y, X, and leafroll: Research strategy, selection procedures and experimental results. In: Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato. Report of the III Planning Conference. International Potato Center (CIP), Lima, Peru. November 20-22: 155-171.
- Mih, M. y Atiri, G.I. 2005. Overview of Irish potato viruses and virus diseases. *Plant virology in sub-Saharan Africa*. Consultado el 4/04/2012 en URL: http://www.iita.org/info/virology/pdf_files/334-341.pdf
- Rodríguez Galdo, M.J. y Dopico, F. 1980. Novos cultivos e agricultura tradicional: a pataca en Galicia nos séculos XVIII e XIX, *Revista Galega de Estudos Agrarios*, 3.
- Rolland, M., Glais, L., Kerlan, C. y Jacquot, E. 2008. A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable Potato virus Y group and variant characterization. *Journal Virological Methods* 147(1):108-17.
- Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (eds). 1999. La patata. Mundi- Prensa, Madrid.

- Rossignol, D. y Rousselle-Bourgeois, F. 1999. Botánica, morfología y toxonomía. En: P. Rousselle, Y. Robert, J.C. Crosnier. La Patata. Ed. Mundi-Prensa. Capítulo 2: 53-75.
- Salazar L.F. 2003. Potato viruses after the XXth century: Effects, dissemination and their control. Entrada el 3/12/2003, consultado el 11/04/2012. URL: http://www.crawfordfund.org/assets/files/awards/Potato_Viruses_after_the_20th_Century.pdf
- Shepard, J.F. y Clafatin, L.E. 1975. Critical Analyses of the Principles of Seed Potato Certification. Annual Review of Phytopathology 13: 271-293
- Simons, J.N. y Zitter, T.A. 1980. Use of oils to control Aphid- borne viruses. Plant disease 64 (6): 542-546.
- Slack, S.A. y Singh, R.P. 1998. Control of viruses affecting potatoes through seed potato certification programs. En: A. Hadidi, R.K. Khetarpal, y H. Koganezawa (eds). Plant Virus Diseases Control. APS Press. Capítulo 19.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, D.H. y Archer, S.A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa.Madrid.
- Schubert, J., Fomitcheva, V. y Sztangret-Wiśniewska, J. 2007. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. Journal of Virological Methods 140(1-2): 66-74.
- Spaar, D. y Harmann, U. 1977. Kartoffel. En Klinkowski. M. *Et al.*, Ed. Pflanzliche Virologie, vol. 3, 3rd edicion,Akademie-Verlang, Berlin, p.63-113. Citado por Sutic, D.D., Ford, R.E. y Tosic M.L. (eds). 1999. Handbook of Plant Virus Diseases. CRC Press, USA. Capitulo 4: 247.
- Sutic, D.D., Ford, R.E. y Tosic, M.L. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press USA.
- Thornbury, D.W., y Pirone, T.P. 1983. Helper component of two potyviruses are serologically distinct. Virology 125, 487-490.
- Were, H.K., Narla, R.D., Nderitu, J.H. y Weidemann, H.L. 2003. The status of potato leafroll virus in Kenya. Journal of Plant Patology, 85: 153-156.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cultivo de la patata es el más importante de la comarca de A Limia (Ourense) con una superficie que oscila entre las 3100 y las 3500 ha anuales en regadío en los últimos 10 años y con producciones medias entre 35 y 40 t/ha. Para cubrir las necesidades de material vegetal de propagación serían necesarias, en torno a 7000 t de patata de siembra cada año ($2000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Como los precios medios de patata certificada de categoría A pueden superar los $1,3 \text{ €kg}^{-1}$ para el calibre 28/35 y $0,75 \text{ €kg}^{-1}$ para el calibre 35/50, esto supone un coste de unos $1800\text{-}2000 \text{ €ha}^{-1}$ y en el total de la comarca unos costes de en torno a 5,6-6,7 millones de €

En 1999, cuando se iniciaba el programa de análisis de lotes de patata de reemplazo, la cantidad analizada en el Instituto do Campo fue de 750 t de patata (www.institutodocampo.com). En la actualidad se estima que sólo un 60% de la superficie se siembra con patata certificada pero es una cifra muy variable y dependiente de múltiples factores como: la cantidad de patata sobrante del cultivo anterior si el precio está muy bajo, el coste y disponibilidad de patata de siembra certificada, la situación económica del agricultor, la superficie a sembrar, etc. En algunos casos, cuando una variedad deja de estar protegida, aumenta el reemplazo porque disminuye la cantidad de patata certificada disponible en el mercado, o disminuye su calidad. En ese sentido, hay que tener en cuenta que según el “derecho del agricultor” cualquier utilización de variedades no protegidas es libre para su multiplicación por parte del agricultor. En el ámbito europeo, la Organización Española de Variedades Vegetales (OEVV) ha hecho un estudio sobre la situación del uso de semilla de explotación en los Estados miembros de la UE. El estudio muestra que el uso de la semilla de reemplazo sigue bastante arraigado en la práctica agrícola de las pequeñas explotaciones, encontrándose niveles dispares de utilización de semilla de reemplazo entre estados miembros. Según afirma Carlos Mateos, de los Servicios técnicos de COAG, en muchos ámbitos prevalece la teoría de que *“Las semillas son recursos fitogenéticos, considerados patrimonio colectivo, fruto de la mejora y conservación durante generaciones por los agricultores, por lo que el derecho del agricultor a reproducir y conservar sus propias semillas en su explotación es irrenunciable y las semillas no deberían ser apropiables por nadie”*. El promedio en el conjunto de la UE del uso de semilla de reemplazo podría

representar para la patata en torno al 62% del material de reproducción utilizado para las cosechas.

El precio de la patata de la variedad Kennebec pagado al agricultor en los últimos 10 años ha oscilado entre los 0,05/0,07 y los 0,35 €kg⁻¹, con una media de 0,14 €kg⁻¹ mientras que para la variedad Agria la media es algo inferior, en torno a los 0,12 €kg⁻¹. En base a datos de 10 agricultores con una media de 20 ha de patata cada año, los costes de producción en 2011 están en torno a los 0,14€kg⁻¹, de los cuales la patata de siembra certificada supondría más de un 30% del coste total (Tabla 0.1). La superficie media de patata plantada por agricultor a título principal en A Limia es de 8 a 10 ha, con un mínimo en torno a 1 ha y máximo de 54 ha y actualmente hay más de 30 agricultores con más de 20 ha. La superficie que un agricultor tendría que reservar para producir su propia siembra estaría en torno a un 20% (1 ha por cada 5 ha). Lo más común es que cada año una parte se adquiera patata certificada y otra se reemplace, de este modo los costes por kg pasarían a ser de unos 0,13 €kg⁻¹.

Tabla 0.1 Superficies y costes de producción medios (\pm dt) del cultivo de patata y trigo en A Limia (2011).

	Trigo	\pm dt	Patata	\pm dt	Media
Superficie media (ha)	33,7	15,1	20,0	9,4	53,7
Prod. Media (Kg·ha ⁻¹)	3550,0	600,9	39500,0	3951,1	
coste por ha (€)	647,0	82,9	5063,0	704,8	2119**
coste por kg (€)	0,19	0,04	0,13*	0,01	

*Considerado coste “real” utilizando parte de siembra certificada y parte reemplazo

**Coste medio por ha considerando que de la superficie total 2/3 son de trigo y 1/3 de patata

Fuente propia

Los riesgos de utilizar patata de reemplazo ya se han mencionado en la Introducción General y, si no se conoce la procedencia de esa patata **no hay justificación** para su utilización. Es por ello que en la normativa de Producción Integrada (PI), es obligatorio su uso; y en 2014 entra en vigor la “*Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas*” lo que implica, entre otros muchos requisitos, el paso de la producción agrícola a PI. Pero, mientras se concreta la aplicación de dicha directiva en una zona

y cultivo donde en la actualidad no hay ni una sola ha en PI, hay escenarios diferentes a considerar:

I. La patata procede de cosecha de consumo de fincas del propio agricultor por lo que podría ser admisible su uso considerando que:

- “No se van a introducir plagas y/o patógenos que no estuvieran ya presentes en las fincas del agricultor”
- El nivel de virosis y otros patógenos del tubérculo puede ser analizado y la patata seleccionada para evitar utilizar lotes a partir de ciertos niveles de infección que den lugar a descensos de producción y/o calidad inaceptables.

Teniendo en cuenta esas consideraciones, los costes de producción con el reemplazo bajarían a **0,10 €kg⁻¹** al considerar como coste de la patata de siembra el coste de producción de patata de consumo utilizando certificada (0,14 €kg⁻¹).

II. La patata procede de fincas del propio agricultor elegidas y gestionadas de la misma forma que se hace en la producción de tubérculo para patata de siembra certificada, con las siguientes características:

- Fincas en las que se hacen rotaciones largas y están libres de patógenos que pasen a la patata.
- Material de partida de la mejor calidad sanitaria posible (Élite o Super Élite)
- Fechas de siembra evitando vuelos de pulgones
- Eliminación de plantas sospechosas al inicio de brotación (depuración)
- Tratamiento del tubérculo en siembra con insecticidas sistémicos residuales para el control de pulgones que transmiten PLRV y otros virus persistentes.
- Eliminación de matas cuando se inicia el pico de población de pulgones alados a final del verano.

Llevando a cabo estas medidas, los costes de producción de esta patata para siembra se estima que podrían estar en torno a 0,3 €kg⁻¹. Por tanto el coste de producción de patata de consumo utilizando estas patatas de producción propia especializada como siembra bajaría a **0,11 €kg⁻¹**.

III. La patata para reemplazo tiene niveles medios de sólo uno de los virus importantes y un buen nivel de resistencia o no hay material certificado de la variedad de patata local que se pretende producir y el material existente tiene un nivel elevado de virosis y buena resistencia de campo como por ejemplo en la variedad Fina de Carballo. El agricultor puede:

- Adoptar prácticas de manejo del cultivo para intentar compensar los daños producidos por los virus: abonado, riego, densidad de plantación.
- Seleccionar los tubérculos para la siembra

Los costes de producción en este caso se incrementarían solo ligeramente.

Para optimizar la utilización o producción de esta patata de re-emplazo se marcaron los siguientes objetivos en esta Tesis:

1. Evaluar la calidad del material de reemplazo en A Limia entre los años 2001 y 2003 – CAPITULO 1.
2. Evaluar el efecto en la producción de patata en A Limia cuando se utilizan lotes de patata de reemplazo con niveles conocidos de virosis (PVY y PLRV), otros patógenos y daños – CAPITULO 2.
3. Optimizar el protocolo DIP-ELISA de detección rápida y económica de PVY y PLRV que pueda ser utilizados por los técnicos o los propios agricultores – CAPITULO 3.
4. Utilizar cultivos borde y tratamientos con aceites para limitar la transmisión de PVY en parcelas para producción de patata de siembra/reemplazo con niveles de virosis aceptables – CAPITULO 4
5. Estudiar el efecto del manejo del abonado nitrogenado en cobertura sobre los cultivos de patata de reemplazo – CAPITULO 5.

CAPITULO 1

CAPITULO 1: Evaluación de la calidad del material de patata de reemplazo en A Limia entre los años 2001 y 2003.

RESUMEN

En el año 2001 se inicia en el Instituto do Campo (INORDE) un programa de evaluación de calidad de lotes de patata para reemplazo que se clasificaron en función de su procedencia en “siembra”, “siembra+consumo” y “consumo”. Entre 2001 y 2003 participaron 275 agricultores que enviaron 463 lotes de patata, principalmente de las variedades Agria y Kennebec. Para cada lote se analizaron las virosis y otros patógenos y daños según la normativa a aplicar a la patata de siembra certificada y se hicieron recomendaciones de siembra / no siembra / siembra condicionada y estimación de pérdidas en caso de siembra. Los factores que más condicionan la calidad de la patata para reemplazo son el tipo de producción que lleva a cabo el agricultor y las peculiaridades de cada año. El virus predominante fue el PVY pero el que dio lugar a más recomendaciones de no siembra fue el PLRV y presencia de ambos. La media de ambas virosis en agricultores tipo 1 fue inferior al 15%, nivel aceptable para la tolerancia de Agria y Kennebec. *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Phoma spp.*, *Fusarium spp.* y bacterias de podredumbre aparecen sólo ocasionalmente pero en todos los tipos de producción y todos los años; solo la sarna plateada *Helminthosporium solani* tiene alta prevalencia. La producción de patata específicamente para reemplazo (agricultor tipo 1) puede permitir a algunos agricultores conseguir un material de siembra de calidad aceptable con una reducción importante de costes. El uso de patata sin análisis previo es una práctica de alto riesgo, aunque solo un porcentaje bajo de lotes presentaron niveles de virosis y otros daños superiores al 70%.

Palabras clave: patata de siembra, reemplazo, virus

INTRODUCCIÓN

La producción de patata de siembra certificada en la actualidad se basa por un lado en el cultivo en condiciones controladas para conseguir tubérculos libres de los patógenos que se transmiten vía tubérculo (Gudmestad, 1991) y por otro en la existencia de métodos rápidos de diagnóstico (Clark y Adams, 1977) de esos patógenos presentes en los tubérculos que permitan descartar lotes “degenerados”.

Las virosis son las principales causas de degeneración y el PVY la principal causa de descalificación de lotes en muchas zonas de producción a pesar de que la resistencia o tolerancia a ese virus está ya incluida en mayor o menor medida en la mayoría de las variedades comerciales (Mendoza *et al.*, 1989; Solomon y Barker, 2001). Tradicionalmente, son las zonas altas o las zonas costeras con vientos dominantes procedentes del mar las que se dedican a la producción de patata de siembra pues la

ausencia o menor actividad de pulgones permite conseguir bajos niveles de virosis en los tubérculos. En muchos países hay zonas de producción costeras (Bretaña en Francia; Escocia en el Reino Unido) y la hubo en Coristanco (A Coruña). En España la mayor parte de la producción está en zonas de cierta altitud de Castilla León y País Vasco.

El mayor grado de degeneración se produce cuando coinciden varios virus, aunque sean débiles, en el mismo tubérculo, pero en la normativa en vigor (Tablas 1, 2 y 3 de la Introducción General) se contempla exclusivamente la suma de muestras positivas para PVY y PLRV, como los dos virus más importantes y con mayor influencia en la producción de patata de consumo (Salazar, 2003).

Muestras de los tubérculos producidos siguiendo la normativa de producción de patata de siembra certificada son analizadas y de esos análisis se obtiene una estimación del total de virosis en el lote y con ello la adjudicación de la categoría correspondiente (Ellisèche *et al.*, 1999). Aunque las virosis son el factor que marca la calificación objetiva de los lotes y, por tanto, su categoría, otros problemas son evaluados (Tabla 2 de la Introducción General), normalmente de forma visual siguiendo escalas/porcentajes de superficie cubierta con signos de algún patógeno concreto (esclerocios de *Rhizoctonia*), aunque a veces se agrupan síntomas que pueden pertenecer a diferentes patógenos: hongos/bacterias (“sarnas”, “podredumbres secas o húmedas”), fisiopatías o daños físicos (heridas, golpes, deformaciones, restos de tierra). Los patógenos de cuarentena (Tabla 3 de la Introducción General) deben estar completamente ausentes de toda patata certificada, sea cual sea su categoría y hay inspecciones independientes para detectarlas.

Según la normativa vigente, hay una serie de motivos para descalificar un terreno o una zona de producción pero lo más frecuente es la presencia de patógenos de cuarentena en el suelo, como es el caso de los nematodos del quiste del género *Globodera* (Rouselle *et al.*, 1999). Son patógenos que están muy extendidos por todas las zonas de producción pero todavía hay países y/o zonas libres y por tanto no puede circular material certificado que pueda venir de suelos infestados. En A Limia, *G. rostochiensis* se detectó por primera vez en 1973 (Martínez-Beringola *et al.*, 1987) y pronto se vio que estaba ya muy extendido; se hizo una prospección en 2000 (Rosende *et al.*, 2003) y en varios muestreos posteriores desde esa fecha se ha podido apreciar cómo *G. rostochiensis* y ahora también *G. pallida* se han ido extendiendo. La comarca

de A Limia deja, por tanto, de producir patata de siembra certificada definitivamente en los años 80. Sin embargo, algunas zonas de esta comarca siguen presentando buenas características para la producción de patata de siembra teniendo en cuenta los niveles de pulgones vectores (Pérez *et al.*, 2004) y, por tanto, podrían ser válidas para producción de “siembra propia” por parte de los agricultores o para el reemplazo, haciendo una selección previa de lotes (Gildemacher *et al.*, 2007).

El coste de la patata de siembra certificada se estimó en 2000 en torno a un 29% de los costes de producción de la patata en A Limia (www.institutodocampo.com) pero con los datos recogidos en 2011 que se reflejan en el apartado de Justificación y Objetivos, habrían pasado a suponer casi el 35%. Ese coste se ve considerablemente reducido utilizando patata de reemplazo. En la provincia de Ourense se estima, en base a los datos nacionales, que en los años de este estudio se utilizan cada año entre 1200 y 1800 t de patata de reemplazo (“reserva para siembra”) lo que supuso un 15-20% del total de siembra empleado (Tabla 1.1) pero concretamente en A Limia es superior (en torno al 30%). En todo caso, son valores muy variables por depender en gran medida del precio de venta de la patata de consumo, del precio y disponibilidad de patata de siembra certificada y de la cantidad de patata sin vender en los almacenes. Hasta la creación por el INORDE (Instituto Ourense de Desenvolvemento) del Instituto do Campo (hoy denominado “Centro de Desenvolvemento Agrogandeiro”) ese reemplazo se hacía sin ningún tipo de control. Los primeros trabajos en la zona tuvieron como objetivo determinar la presencia de virosis en la zona, en los campos de patata de consumo, a final de temporada, obteniéndose valores relativamente bajos (Cabaleiro *et al.*, 2000) que indicaban que se podría obtener patata para siembra con unos niveles aceptables si se seguían una serie de recomendaciones en la producción.

Tabla 1.1 La patata en la provincia de Ourense (superficie, producción, semilla utilizada y reserva de siembra) en los años del estudio (2000 a 2003).

	Superficie (ha)	Producción (t)	Total semilla utilizada (t)	Reserva siembra (t)*
2000	6.289	177.769	10.832	1.815
2001	6.900	198.415	10.377	1.633
2002	6.462	189.277	9.468	1.291
2003	6.211	175.045	9.897	1.292

Fuente: MAPA. *Valores estimados sobre totales españoles.

En este Capítulo 1 se presenta el análisis de datos resultante de los controles llevados durante los cuatro primeros años de puesta en marcha del programa de análisis de patata para reemplazo llevado a cabo en el Instituto do Campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de material de re-emplazo

Formularios base. Los datos de partida fueron recogidos en el Instituto do Campo en Xinzo de Limia, perteneciente al INORDE y dependiente de la Diputación de Ourense. En la actualidad ha pasado a llamarse Centro de Desenvolvemento Agrogandeiro. Se trata de la puesta en marcha del programa y por tanto los primeros años de toma de datos. Se pretende que sirvan, en primer lugar, como evaluación de la situación, para convertirse posteriormente en un programa de asesoría para intentar limitar el uso de patata de reemplazo y para que, en caso de siembra de reemplazo, los lotes de siembra cumplieren unos mínimos que garanticen una productividad media y que no contribuyan al aumento de patologías en la zona. Al ser el inicio del programa, el número de usuarios no estaba estabilizado y por tanto mucha información sólo se puede interpretar pero no realizar un tratamiento de datos detallado. El número total de lotes analizados y de agricultores participantes, para cada año, se resume en la Tabla 1.2. También cabe destacar la gran diferencia en el número de tubérculos de cada lote a analizar, que depende de la cantidad total del lote, entre 6 y 200, aunque en escasos casos este número es superior a 100 tubérculos.

Tabla 1.2 Número de lotes y agricultores participantes en el programa de evaluación de calidad de patata de reemplazo del Instituto do Campo entre 2000 y 2003.

	2000	2001	2002	2003
Nº Lotes	81	58	129	195
Nº Agricultores	50	37	68	120

Los datos personales de los agricultores, número de muestras, variedad, finca, etc se recogen en una base de datos (Microsoft Office Access) que se completa con los datos de las analíticas realizadas (virosis, hongos y bacterias, fisiopatías y daños). El tratamiento de datos posterior se hizo empleando la hoja de cálculo Microsoft Office Excel.

Clasificación de producciones. Los lotes que se llevaron para analizar al Instituto do Campo se clasificaron en tres grupos según el manejo y el destino final del cultivo realizado en el año anterior. De esta forma obtenemos la siguiente clasificación:

-Producción tipo 1 (Siembra): Plantación de patata categoría E o SE para obtención de patata de siembra y por tanto siguiendo aproximadamente la normativa de producción de siembra certificada:

- semilla tratada con insecticidas sistémicos residuales y fungicidas contra *Rhizoctonia* (si son necesarios).
- Siembra tardía (después del 1 de mayo)
- En todos los tratamientos fitosanitarios aplicados se introducen insecticidas para combatir el pulgón.
- Fertilización con menos nitrógeno y más fósforo.
- Siembra se realiza más densa de lo habitual, con menos riego o en seco.
- Las matas se queman con diquat desde la última semana de julio.

-Producción tipo 2 (Siembra + Consumo): Plantación para producción de patata de consumo, pero reservando la patata de menor calibre para reemplazo.

- En un 80 % es siembra de Kennebec E o SE, el 20 % restante cultiva Kennebec o Agria certificada clase A.
- Tratamiento insecticida para pulgón en siembra y durante los tratamientos del verano.

-Producción tipo 3 (Consumo): Producción de patatas para consumo; ya sea por escasa demanda o por querer aprovechar la patata de menor calibre, el agricultor la envía para el análisis por si la puede reemplazar.

Análisis. El material vegetal entregado por los agricultores fue sometido a los siguientes análisis, observaciones y evaluaciones establecidos en el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Patata de Siembra:

***Virosis:** a todos los tubérculos entregados, salvo escasas excepciones, por muestra y agricultor. El análisis se hizo para los dos virus que figuran específicamente en la normativa de patata certificada, PLRV y PVY; el primer año se analizó también PVX. Los análisis se hicieron a tubérculos brotados, por el método DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) utilizando los anticuerpos y el protocolo recomendado por la empresa que los comercializa (Bioreba A.G., Basilea, Suiza).

***Otros patógenos:** se determinó por cada lote de tubérculos el porcentaje de los mismos, en relación a su peso, con sintomatología de cada una de las siguientes patologías (representadas en la Figura 1.1):

- *Phytophthora infestans*
- *Alternaria solani*
- *Rhizoctonia solani*
- *Phoma spp.*
- *Fusarium spp.*
- *Hemilthosporum solani*
- *Streptomyces scabies*
- Otras bacterias (podredumbres)

***Fisiopatías:** al igual que ocurría con los patógenos, las fisiopatías también se establecen en porcentaje de tubérculos afectados por: grietas, golpes y manchas en la carne.

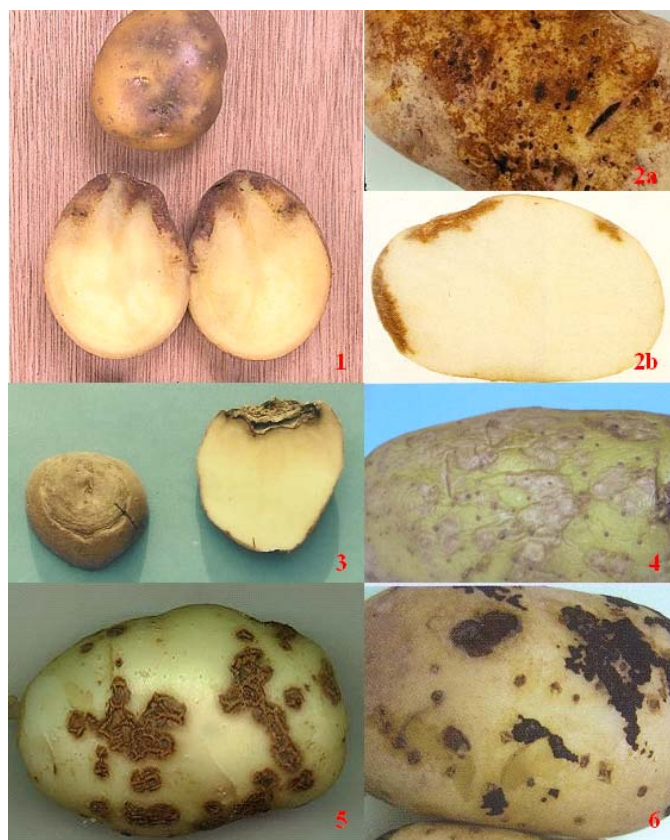


Figura 1.1 Patógenos analizados en el Instituto do Campo: 1. *Phytophthora infestans*, 2a y 2b. *Alternaria solani*, 3. *Fusarium spp.*, 4. *Hemilthosporum solani*, 5. *Streptomyces scabies* y 6. *Rhizoctonia solani*.

Recomendaciones. Con los valores correspondientes a los análisis realizados a cada agricultor, lote y año, se elaboraron columnas de datos de recomendaciones de uso de los lotes que se dieron a los agricultores. Estas columnas de datos tienen una parte de cálculo en base a los umbrales que marca la normativa (Tablas 1.3 y 1.4), sobre todo virosis, aunque sólo se considera como referencia pues los márgenes pueden ser más amplios teniendo en cuenta el virus predominante y la presencia de uno o de los dos virus. Pero la recomendación tiene también un fuerte componente “subjetivo”, basado en la experiencia sobre las fincas y agricultores.

La “recomendación de siembra” se hizo en base a 5 categorías:

1. No sembrar
2. Sembrar incluyendo alguna técnica de cultivo específica: aumentar el abonado nitrogenado, aumentar la densidad de siembra, aplicar tratamientos específicos, etc.
3. Sembrar escogiendo

4. Sembrar escogiendo + incluyendo alguna técnica de cultivo específica
5. Sembrar (sin condicionantes): dentro de normativa y en virosis hasta un 20% (suma de PVY y PLRV cuando están presentes ambos)

Tabla 1.3 Porcentajes máximos de virosis admitidos en la pruebas de pre y post control en material de BASE (Super élite, SE y Elite, E) y material CERTIFICADO A y B (Anexo II del Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra).

	Categoría	%
Semilla base	SE	3
	E	4
	CEE**	7
Semilla certificada	A	7
	B	10

*En el caso de semilla certificada no se considerarán en estas tolerancias máximas las virosis leves, es decir, las que sólo originen síntomas de decoloraciones sin provocar deformaciones del follaje de las plantas. A efectos de este Reglamento se considerarán virosis graves las del PLRV y PVY, así como aquellas que, en una determinada variedad, puedan causar deformaciones en las hojas

**Directiva 93/17 – circulación libre por la UE

Tabla 1.4 Requisitos que ha de cumplir la patata de siembra certificada. Máximos de patógenos y otros daños y deficiencias admitidos en peso (Anexo III del Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra).

CONCEPTO	PORCENTAJE
1. Fuera de Calibre ¹	6
2. Tierra o materias extrañas	2
3. Tubérculos heridos, deformes, roídos o arrugados	3
4. Podredumbre seca o húmeda	1
5. Sarna común (tubérculos afectados en una superficie superior a 1/3)	5
6. <i>Rhizoctonia</i> ²	1
7. La tolerancia total para los puntos 3, 4, 5 y 6 es	6

¹Un lote no podrá contener más del 3 por 1000, expresado en peso, de tubérculos inferiores al calibre mínimo ni más del 3 por 100 de tubérculos de tamaño superior al calibre máximo.

²En *Rhizoctonia* se distinguen tres tipos de ataque: Ligero, medio y grave. La tolerancia del 1 por 100 se refiere a los ataques “medio” y “grave”. En caso de ataque “ligero” se estimará que una partida de patata de siembra se encuentra libre de *Rhizoctonia* cuando el 20 por 100 de la misma, como máximo, presente este tipo de ataque. El resto de la partida, o sea, el 80 por 100, habrá de presentar un ataque menos que “ligero”. Serán rechazadas las partidas que presenten en las yemas o próximo a ellas el ataque definido como “ligero”

Pérdidas. Como información adicional para los agricultores, además de la recomendación genérica, se hizo una estimación de las pérdidas en caso de siembra de lotes no recomendados o siembra sin seguir las recomendaciones. Esas pérdidas serían el porcentaje de merma en la producción que podría producirse y de ahí que la recomendación realizada, no pueda ser fija porque las circunstancias varían cada año (precio de la siembra certificada, precio de la patata almacenada, disponibilidad de patata de siembra en el mercado). Como norma general, cuando la pérdida de cosecha se estima que puede superar el 20 ó 25%, no compensaría sembrar ese lote y se recomienda la compra de semilla. En los casos en los que se sugiere sembrar siguiendo las recomendaciones anteriormente descritas, se podrían reducir considerablemente las pérdidas de producción, pero hay que tener en cuenta que pueden suponer gastos extra de mano de obra (escoger), tratamientos fungicidas o abonos en cobertera.

Análisis de datos. El procesado básico de datos se hizo con el programa Microsoft Excel. No todos los parámetros se analizaron todos los años (PVX sólo el primero). Con los datos se hicieron cálculos de los estadísticos descriptivos más característicos para poder hacer estudios de frecuencias. En los casos en que el número y tipo de datos lo permitieron se hicieron Análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias según Tukey b (programa PASW Statistics 18, de SPSS Inc).

RESULTADOS

Lotes y variedades. El número de muestras/lotes que llegan al Instituto do Campo se incrementó de forma general con los años, pasando de 81 lotes de patatas en el 2000 a 196 en el 2003. Se destacan dos variedades de patata principales: Agria y Kennebec y, en menor medida, Desiree y otras como Monalisa y Stemter. A lo largo de los cuatro años (Fig. 1.2) se observa que Desiree se mantiene siempre en valores inferiores al 10% y relativamente estable. Los lotes de Agria y Kennebec enviados a analizar varían de unos años a otros, pero siempre supusieron más del 70% del total.

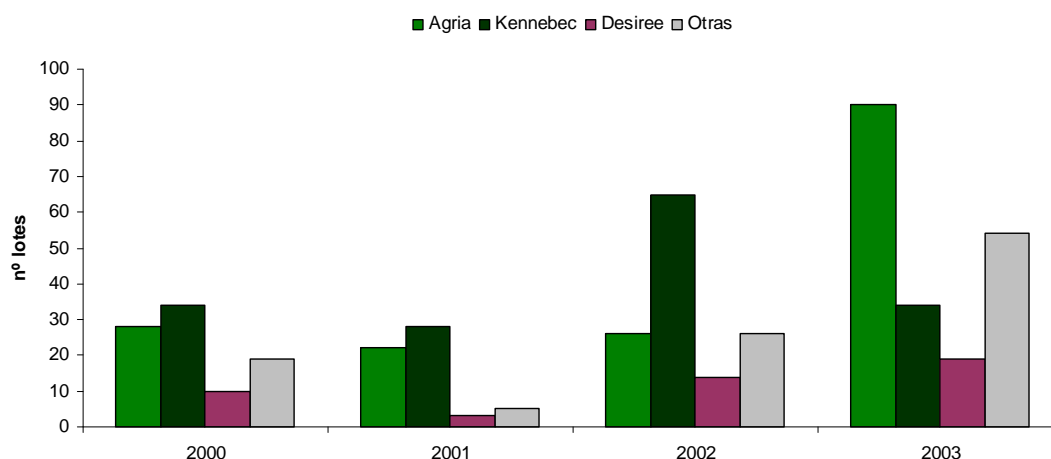


Figura 1.2 Número de lotes de patata de las variedades más comunes en A Limia (Agria, Kennebec y Desiree) y otras minoritarias, en los 4 años de estudio (2000 a 2003).

Tipos de producción. Hay un porcentaje muy alto, con valores siempre superiores al 80% de producciones tipo 3, es decir, de agricultores que exclusivamente intentan aprovechar la patata de consumo no vendida (Fig. 1.3). El año 2001 es un tanto atípico, con un menor número de lotes y agricultores y una distribución diferente al resto de años de estudio. Los agricultores que se han ido incorporando al programa en los años siguientes pertenecen mayoritariamente al tipo 3 pero poco a poco han aumentado los 1 y 2; los del grupo 3 son los que más dependen del año y los precios.

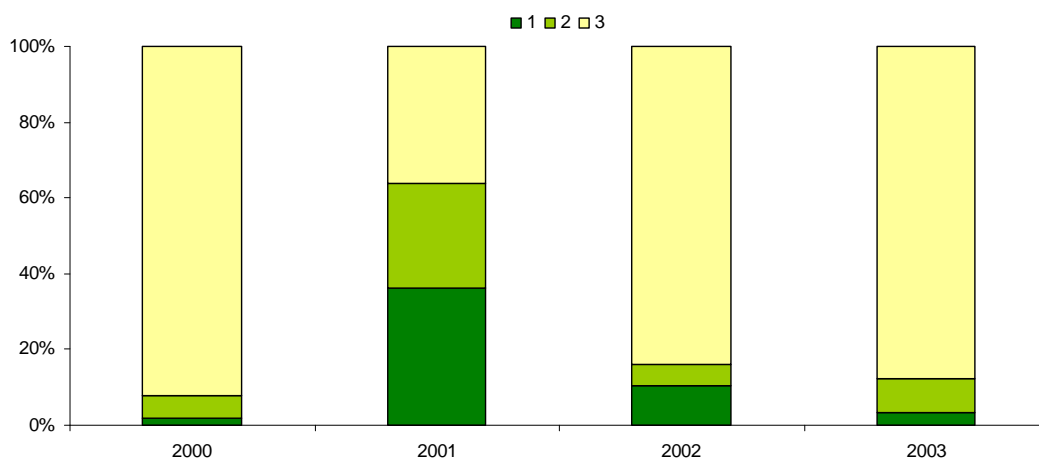


Figura 1.3 Distribución porcentual de los agricultores que hacen cada uno de los tres tipos de producción en los 4 años de estudio; 1 = Siembra; 2 = Siembra + Consumo; 3 = Consumo.

Virosis. El PVX sólo se analizó sólo en 2000 y, en general los valores fueron muy bajos; con un 89% de lotes en el intervalo de 0 a 10% y casi un 50% de los lotes libres de este virus (Fig. 1.4). Dado que la normativa de patata certificada no incluye expresamente este virus, se optó por no incluirlo de nuevo en el estudio.

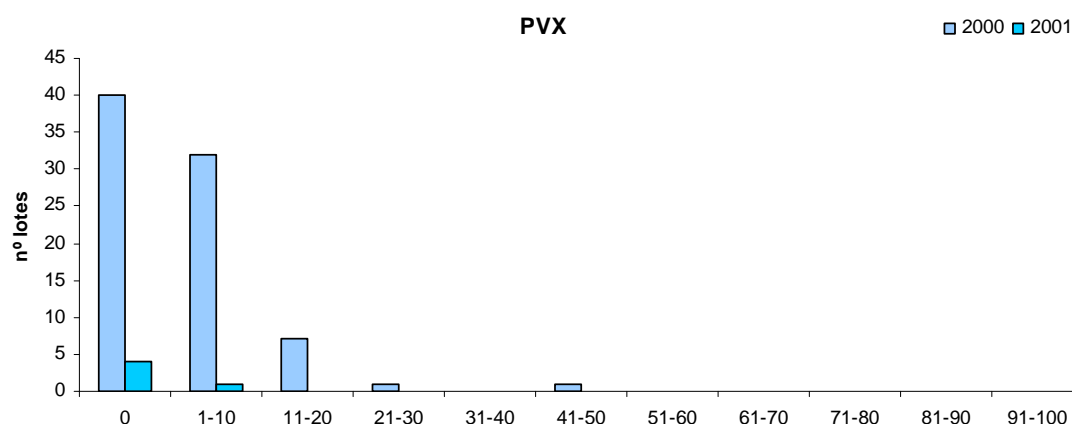


Figura 1.4 N° de lotes infectados de PVX en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.

El PVY sigue una misma dinámica todos los años de estudio salvo en 2001 (Fig. 1.5), observándose que la mayoría de lotes están en el intervalo de 1 a 10% de infección lo que representa del 26 al 39% de lotes. El siguiente grupo más numeroso es el de los lotes en los que no se detectó PVY con porcentajes del 16 al 23%. En el 2001 esta situación es todavía más favorable, invirtiéndose los resultados en los primeros intervalos siendo del 39% el porcentaje de lotes no infectados y del 24% el de infecciones entre el 1 y el 10 %; sin embargo, hay lotes en prácticamente todo el rango, incluso algunos en el 91-100%. Cabe destacar la presencia de un pico, todos los años, en el intervalo del 71 al 80%, debido a distintos agricultores en cada año y a distintas variedades; el 43,7% de los valores pertenecen a la variedad Desiree y en algún caso, en el 2002, los análisis pertenecen a patata Baraka pero de segundo año (ya reemplazada el año anterior).

Para el caso de PLRV los datos también siguen una dinámica similar en los cuatro años de estudio (Fig. 1.6). El año 2000, primer año de estudio, es el único año que presenta valores, en la mayoría de los intervalos, superiores a los restantes años. No hay datos de capturas de pulgones en 1999 que pudieran explicar esos niveles de virosis. El

año 2002 es en el que mejores resultados se obtuvieron, a nivel general, a pesar de que fue uno de los años con mayores poblaciones de pulgones en varias trampas de la zona (Pérez *et al.*, 2004).

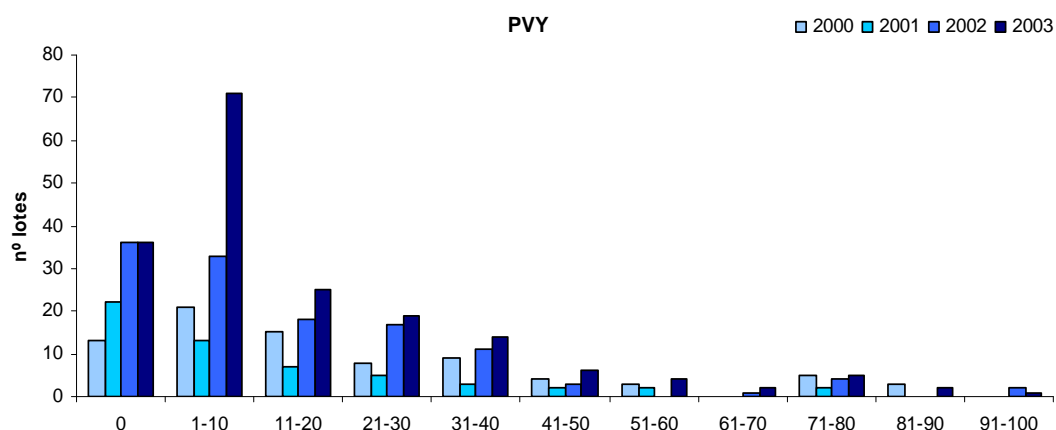


Figura 1.5 Nº de lotes infectados de PVY en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.

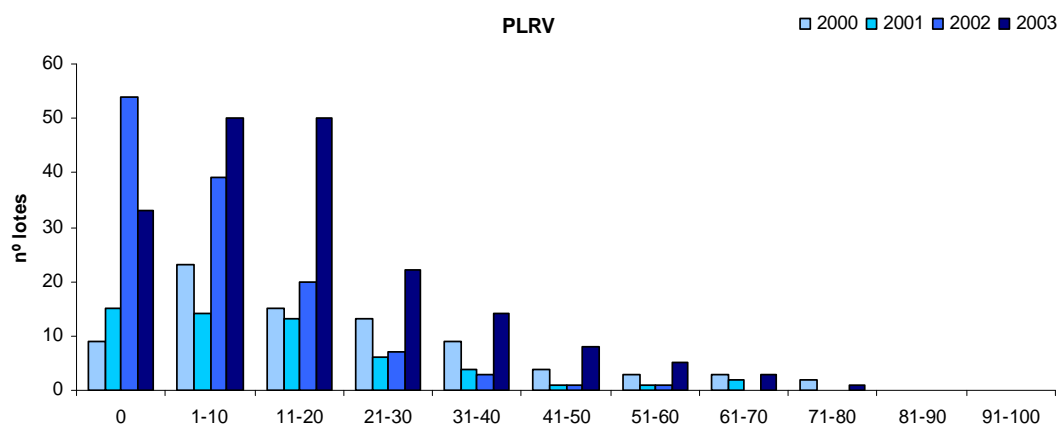


Figura 1.6 Nº de lotes infectados de PLRV en los distintos intervalos de porcentaje de virosis en los lotes analizados de 2000 a 2003.

Relación tipo de producción/virosis/año. Las producciones tipo 1, tal como cabría esperar, son las que mostraron los mejores resultados, con un menor porcentaje de virosis pero con una gran variabilidad.. Entre las producciones tipo 2 y 3 apenas hay diferencias (Figuras 1.7 y 1.8). La gran variabilidad en los datos que, como se vio en las gráficas de frecuencias van de 0 a 90%, hace que sea difícil ver diferencias estadísticamente significativas. Analizando los datos año a año sí que hay alguna

diferencia significativa entre los lotes tipo 1 y el resto para PLRV y también entre años, con los mejores resultados para el año 2002.

En la normativa de producción de patata de siembra certificada los umbrales se hacen con la suma total de porcentaje de virosis. En las gráficas realizadas con la media del porcentaje de virosis total (PVY + PLRV) observamos que éste tiende a disminuir con los años; esto es debido posiblemente al mejor uso de los tratamientos fitosanitarios para combatir el pulgón, sin embargo en 2003 sufre un ligero ascenso, que, puesto que el número de pulgones recogidos en 2002 fue inferior a años anteriores (Pérez *et al.*, 2004), sólo se explicaría con el aumento de producciones tipo 3 de este año respecto al anterior.

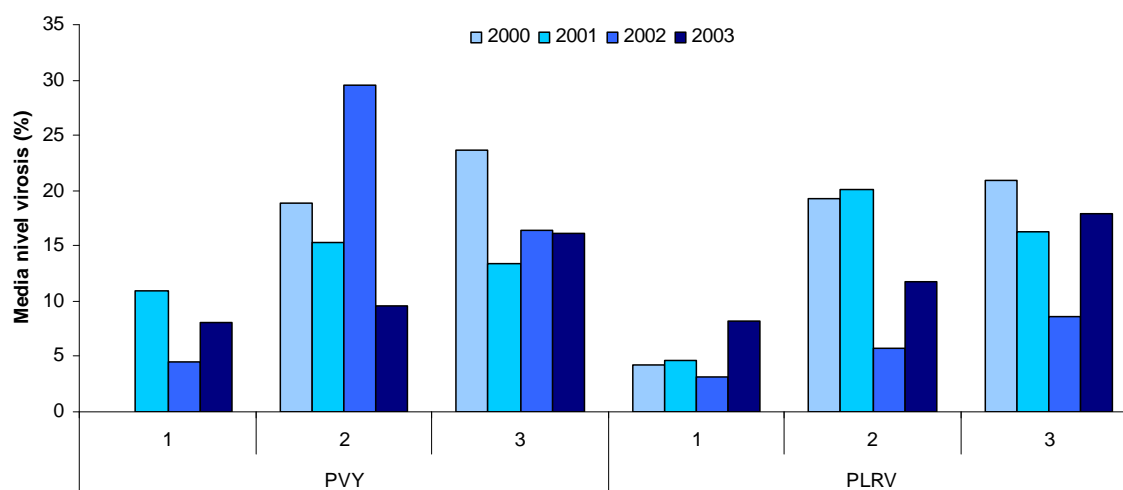


Figura 1.7 Media del porcentaje de infección de PVY en los 4 años del estudio (2000 a 2003) según tipo de producción (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). En el año 2000 no hubo producciones tipo 1.

Si se tiene en cuenta estrictamente la normativa de producción de patata certificada, un 26 % de la totalidad de los lotes cumplirían como certificada B al poseer porcentajes de infección globales inferiores al 10%. El 2002 sería el año de mejores resultados con un 38 % de lotes dentro del intervalo de aceptación. Considerando certificada A este valor se reduciría al 18%, manteniéndose el 2002 como el mejor de los años con un 28% de lotes con porcentajes de infección inferiores al 7%. Considerando el tipo de producciones y la suma de PLRV y PVY, independientemente del año, las producciones tipo 1 presentan resultados significativamente mejores que las tipo 2 y 3 (Fig. 1.8).

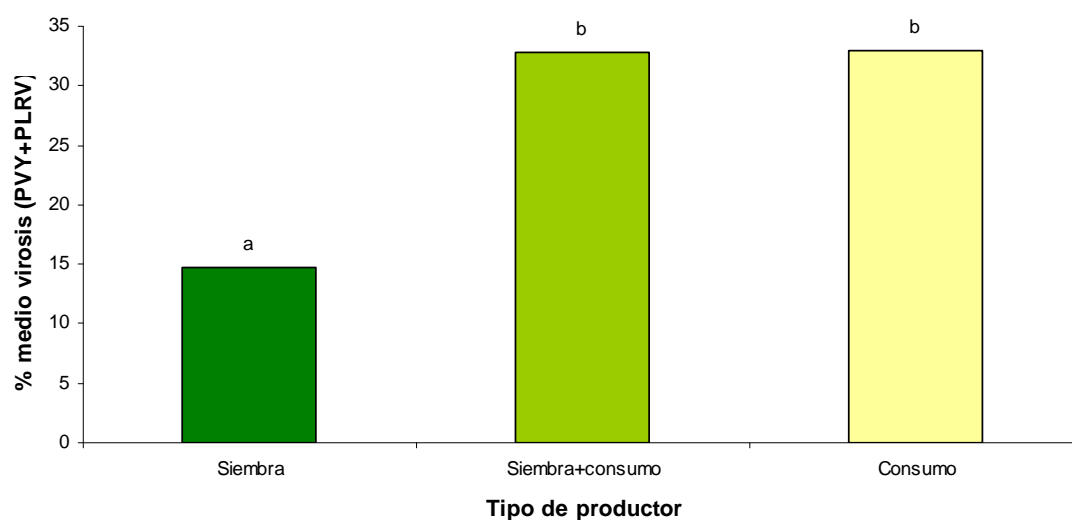


Figura 1.8 Media del porcentaje de infección de virosis total (PVY+PLRV) según tipo de producciones (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según Tukey-b.

Variedades mayoritarias/virosis. Los pocos lotes de la variedad minoritaria Desiree fueron los que presentaron mayores porcentajes de los tres virus (PVX, PVY y PLRV) casi todos los años y los de otras variedades fueron muy variables y normalmente altos (Fig. 1.9). En Agria fueron mayores los porcentajes de infección de PVX (sólo 2000) y PLRV y en Kennebec los de PVY. Considerando el total de virosis Agria siempre presentaron valores menores pero tanto Agria como Kennebec mejoraron a lo largo de los años de estudio

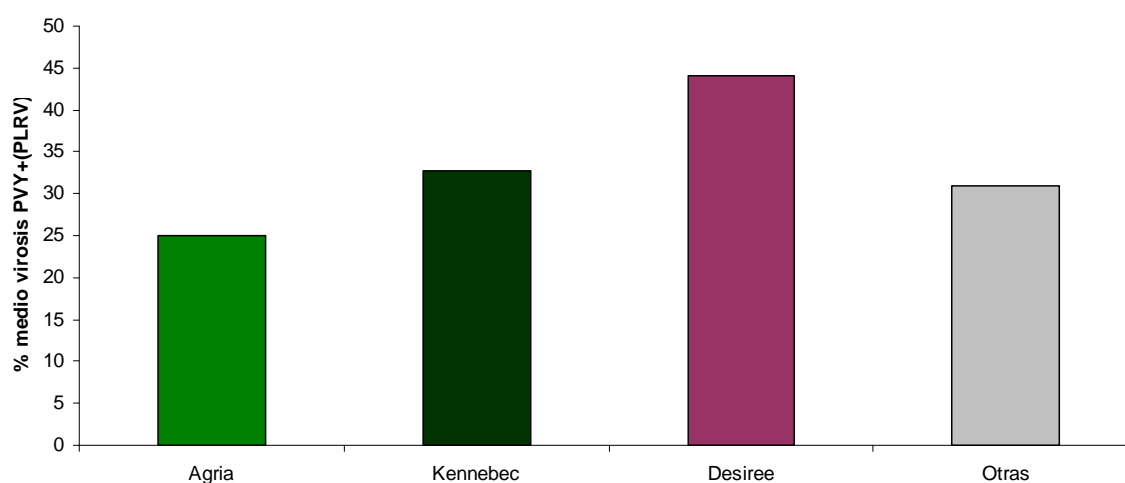


Figura 1.9 Porcentajes medios de infección de virosis total (PVY+PLRV) para las principales variedades de estudio (Agria, Kennebec, Desiree y otras). Media de los cuatro años de estudio (2000 a 2003).

Otros Patógenos

***Rhizoctonia solani*:** un 90% de los lotes se encontraron en valores menores del 10% de infección. Cabe destacar un 41% de lotes del conjunto de los cuatro años de estudio con un porcentaje hasta el 1% de *Rhizoctonia* que ascendió al 83% si tenemos en cuenta lotes con infecciones hasta el 6%. (Fig. 1.10).

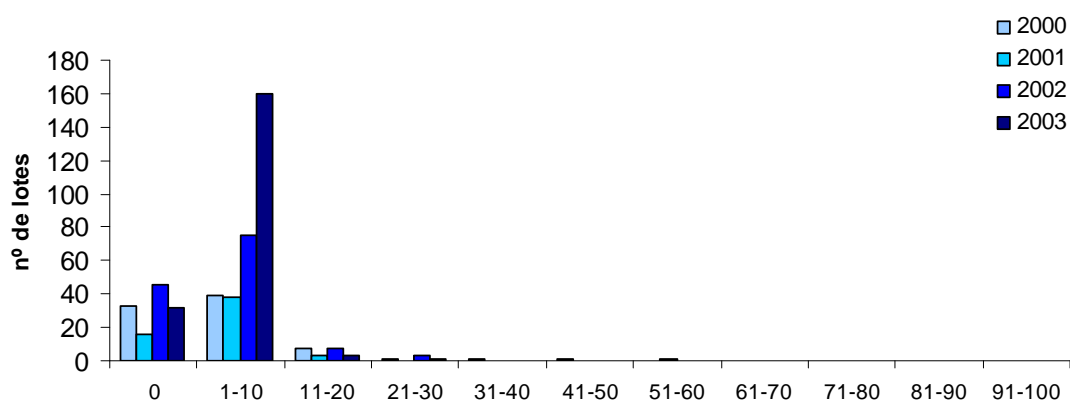


Figura 1.10 Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de *Rhizoctonia solani*.

***Streptomyces spp*:** Para la sarna común, el mayor porcentaje de casos estuvo en el intervalo del 1 al 10% de infección tal como se muestra en la Figura 1.11. Un 61% de los lotes de tubérculos recogidos en los cuatro años de estudio solo tendrían un 5% de infección o menos, valores positivos de cara al reemplazo.

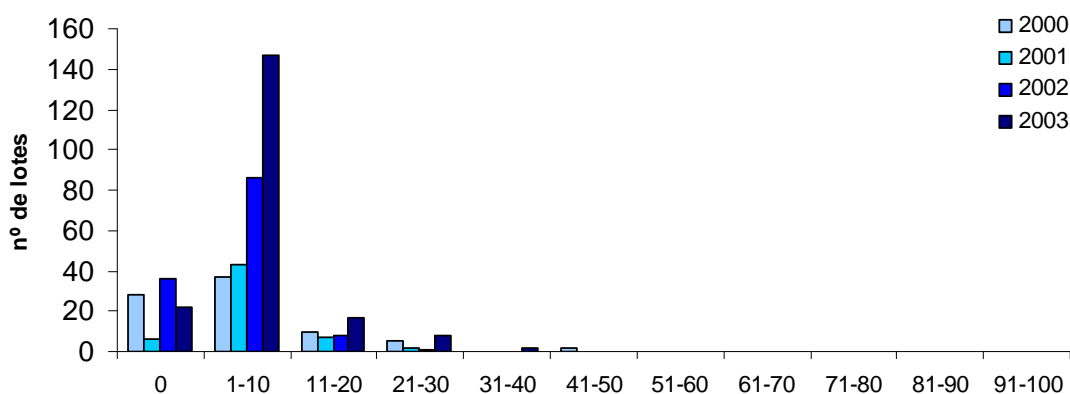


Figura 1.11 Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de *Streptomyces scabies*.

Hemilthosporum solani: la sarna plateada no aparece como tal en la normativa y sin embargo es el patógeno que, con diferencia, se encontró con más frecuencia en los lotes analizados y en el que se observó un mayor crecimiento en la incidencia. En 2000 los porcentajes más altos de lotes infectados se encontraron en el intervalo del 11 al 20%, en 2001 entre el 10 y el 30% y en 2002 y 2003 casi la totalidad de los datos pertenecieron a los intervalos que van desde el 21 al 40% (Fig. 1.12).

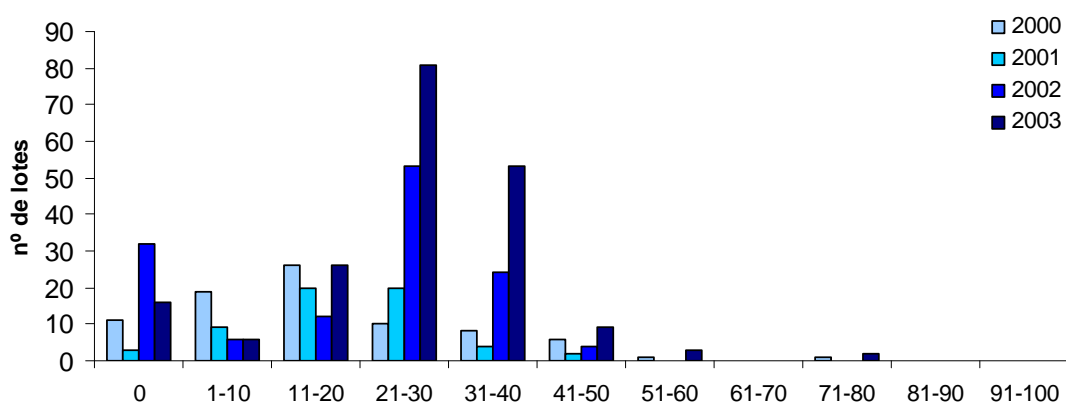


Figura 1.12 Evolución del porcentaje de lotes de patata en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de nivel de infección de *Hemilthosporum solani*.

Los análisis de frecuencia muestran que **otros patógenos minoritarios y fisiopatías** aparecen con frecuencias muy bajas (*Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Fusarium spp.*, *Phoma spp.* y bacterias). En esos casos los valores cumplen la normativa y los tubérculos podrían utilizarse sin problemas para siembra.

Para la mayoría de estos patógenos las producciones tipo 1 presentaron porcentajes de presencia menores, pero la variabilidad de los datos fue muy alta y en todos los casos hubo algún año “excepcional” o algún lote con niveles muy altos que hicieron que las desviaciones fueron muy grandes y que sólo se pueda hablar de tendencias.

Tanto Agria como Kennebec tuvieron un comportamiento similar en los años de estudio, con excepciones en algunos años concretos (más sarna común en 2000 y *Rhizoctonia* en 2001 en Agria, por ejemplo).

En cuanto a las fisiopatías, entre los datos recogidos por el Instituto do Campo figuran los “golpes”, pero al igual que ocurre con algunas enfermedades mencionadas, no es un factor de especial relevancia para llevar a cabo un reemplazo; el porcentaje admitido por legislación es del 3%. La mayoría de lotes afectados tuvieron valores inferiores al 10%, 0 en el 72% de los casos y llegaron al 81% tomando como límite el 3%. Hubo un claro descenso de los golpes a medida que avanzan los años, desapareciendo totalmente en el 2003; las patatas de producción tipo 1 presentaron menor incidencia de golpes que el resto (Fig. 1.13).

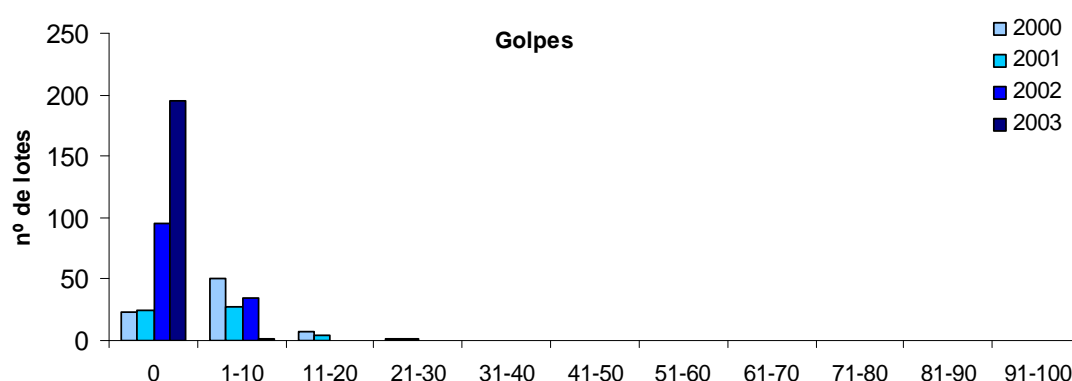


Figura 1.13 Evolución del porcentaje de lotes de patatas en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según intervalos de afección por “golpes”.

Recomendaciones. En las recomendaciones se ven las diferencias entre tipos de producciones. Todos los años se produjo un aumento del porcentaje de recomendaciones de no sembrar y de sembrar tratando en el tipo 3 frente al 2, mientras disminuyó o se mantuvo en valores semejantes el porcentaje de recomendaciones de sembrar. Por lo que respecta a las producciones tipo 1, hay menos datos y con mayor variabilidad, pero se recomendó sembrar hasta a un 80% en 2002; sin embargo, en 2003 a un 50% de los lotes de ese grupo no se les recomendó la siembra (Figura 1.14).

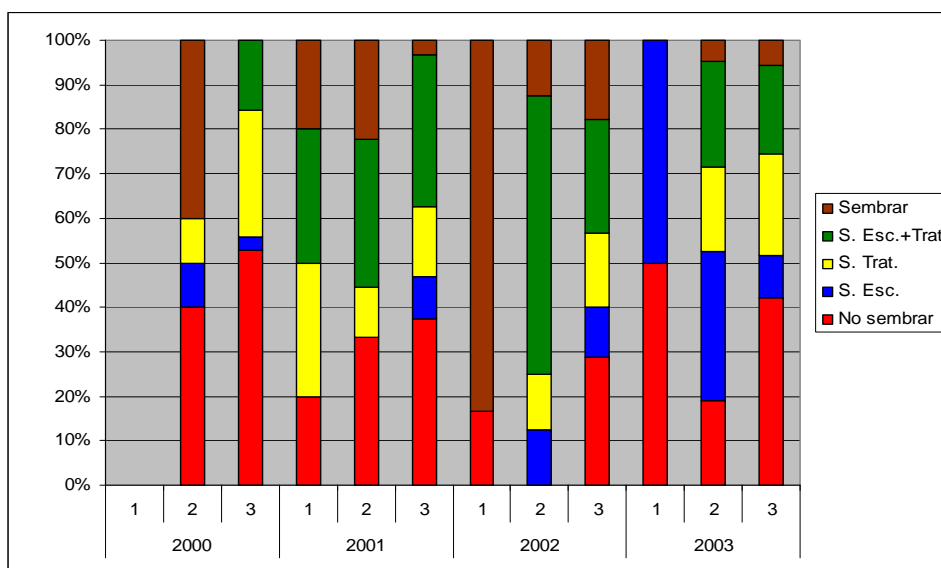


Figura 1.14 Porcentaje de lotes a los que se recomendó sembrar, sembrar tratando, sembrar escogiendo, sembrar tratando+escogiendo o no sembrar, en los 4 años de estudio (2000 a 2003) para cada tipo de lotes (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo).

Pérdidas. Las pérdidas estimadas para los distintos lotes a los que se recomendó sembrar o sembrar condicionado, fueron disminuyendo con los años con la excepción del 2003 donde se observó un ligero ascenso que pudo ser debido al aumento de virosis relacionado con ese año (Fig. 1.15). Tanto en 2002 como en 2003 se obtuvo un mayor porcentaje de lotes infectados de *Hemilthosporum solani* y las pérdidas estimadas alcanzaron valores más altos para producciones tipo 2 y, sobre todo, 3 (Fig. 1.16).

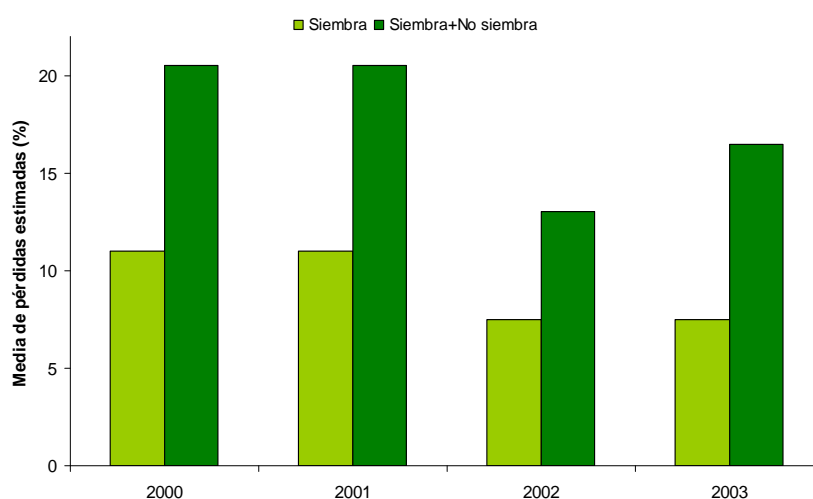


Figura 1.15 Pérdidas medias estimadas para los 4 años de estudio (2000 a 2003): con todos los datos (1-4, Siembra + 5, No siembra) y con la eliminación de los datos en los que se recomienda “no sembrar” (Siembra).

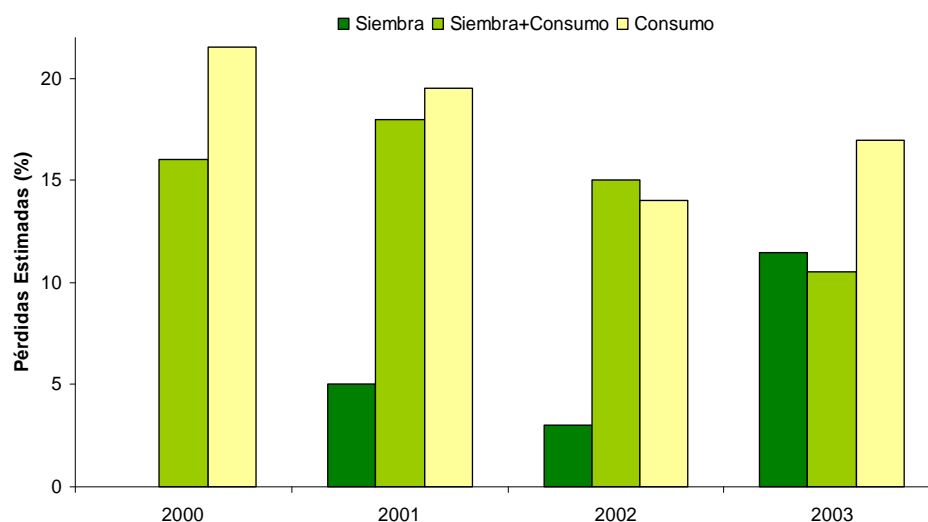


Figura 1.16 Media del porcentaje de pérdidas estimadas en los 4 años de estudio (2000 a 2003) según tipo de producción (1 = Siembra, 2 = Siembra + Consumo y 3 = Consumo). En el año 2000 no hubo producciones tipo 1.

DISCUSIÓN

Desde que finalizó el derecho exclusivo de comercialización, la calidad de la patata de siembra de la variedad Kennebec ha descendido considerablemente y lo mismo ha empezado a ocurrir con Agria (Quintas, 2000). La Comunidad Autónoma Gallega y el sector demandan la producción de material garantizado y a precios asequibles. En el año 2000 se iniciaron estudios para determinar la viabilidad del cultivo de patata de siembra en varias comarcas de Ourense (Cabaleiro *et al.*, 2000) y varias empresas han producido Kennebec y otras variedades desde 2002 pero los costes de producción son altos y la rentabilidad es baja por lo que no parece que en un futuro próximo se vayan a incrementar las producciones. Las dos variedades mayoritarias (80%) son variedades libres, poco interesantes para los productores de siembra certificada. Además, Galicia y más concretamente A Limia, son de las últimas zonas de siembra y la falta de semilla es bastante habitual. Al no haber contratos de producción de siembra nacionales o extranjeros a veces falta semilla y la que hay es de menor calidad.

Muchos años el material a la venta es insuficiente o su precio es muy elevado: suele estar entre 0,60 y 0,80 € de media para calibres 35/50 pero hay años en los que

alguna variedad ha superado 1,40 € en calibres 28/35 (Ríos, 2007). Si, además, el precio de venta de la patata de consumo ha sido muy bajo (en torno a 0,15 € en 2008; 0,06 € en 2011) o se ha vendido mal, la “tentación” de utilizar la propia patata para siembra es muy alta. Incluso en la normativa de la Indicación Geográfica Protegida Pataca de Galicia se contempla la posibilidad del reemplazo: *“Únicamente podrán dedicarse a la obtención de patatas amparadas por la Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) "Pataca de Galicia" o "Patata de Galicia", las patatas de consumo de la variedad KENNEBEC, procedentes de semilla certificada, o reemplazo controlado procedente de la propia explotación, cultivadas y obtenidas en las parcelas aptas (sanas, sin ningún tipo de enfermedades) y ubicadas dentro de las subzonas de producción definidas e inscritas en los registros del Consejo Regulador”*.

El reemplazo es una práctica relativamente frecuente en A Limia, a pesar que es bien sabido que el uso de patata de siembra certificada garantiza unas mejores producciones (Andrade *et al.*, 2008); es común en otras muchas zonas de producción, a nivel de la UE se estima (en base al mencionado estudio de la OEVV) en un 62% el uso de semilla de reemplazo (Mateos, 2009) porque en muchos países – sobre todo los del Este – “el uso de la semilla de reemplazo sigue bastante arraigado en la práctica agrícola de las pequeñas explotaciones”. Ese mismo estudio de la OEVV destaca que su uso está estrechamente vinculado a las estructuras agrarias, al tamaño de la explotación y a la tradición de reutilizar la semilla en la propia explotación, más que a cualquier otro parámetro relacionado con el tipo de sistema de remuneración establecido. En otras zonas del mundo y en países en vías de desarrollo, la selección de semilla propia se contempla como una alternativa cuando no es posible la producción controlada de semilla (Gildemacher *et al.*, 2007).

La puesta en marcha por el Instituto do Campo del programa de análisis y evaluación de lotes de reemplazo se hizo en principio para conocer el nivel de calidad de esa patata que los agricultores estaban utilizando y posteriormente como una vía para evitar que se haga reemplazo de lotes que puedan ocasionar grandes pérdidas al agricultor y/o incremento de los patógenos del cultivo que pueden perjudicar a toda la comarca. El número de agricultores que ha participado en el programa de análisis aumentó todos los años, salvo 2001; en 2003 era más del doble del inicial. En la actualidad los agricultores llevan muestras tanto al Instituto do Campo como al Centro Tecnológico da Carne y algunos incluso han empezado a utilizar los kits (PATAKIT)

que se describen en el Capítulo 3 cuyo revelado hace, en una primera fase piloto, la empresa AgroXinzo S.L.

La calidad de los lotes analizados en estos primeros años fue muy variable, dependiendo de la variedad, el año y el tipo de agricultor. Algunos patógenos y fisiopatías aparecen sólo ocasionalmente: *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Phoma spp.* y *Fusarium spp.*, bacterias, manchas en la carne y grietas. Otros aparecen siempre con unos niveles similares todos los años, sobre todo, PVY, PLRV y sarna común. En sarna plateada los porcentajes de infección parecen demasiado altos para recomendar la siembra a pesar de que la sarna plateada no está regulada por la normativa de producción de patata certificada. Los altos niveles de sarna plateada en semilla son debidos principalmente a las deficientes condiciones de conservación de la semilla, es decir, a falta de cámaras frigoríficas. Es un patógeno que en los últimos años está causando problemas, no tanto de daños directos o en conservación sino porque impide la comercialización de la patata como “patata lavada” que empieza a ser una característica casi imprescindible para obtener mejores precios de venta, aunque en A Limia se ha implantado poco (Popkova *et al.*, 1981; Alonso, 2002).

En la producción de patata de siembra certificada se busca, sobre todo, conseguir bajos niveles de virosis que suelen ser el principal motivo de descalificación porque no hay forma de hacer una selección visual previa. La producción de patata de siembra certificada en algunas zonas tradicionales se encuentra amenazada por la imposibilidad de conseguir un control adecuado de virosis, sobre todo de PVY (Handizi y Legorburu, 2002). Los niveles de PLRV se han estabilizado gracias al empleo de insecticidas sistémicos en siembra pero El PVY causa cada vez mayores problemas en todas las zonas de producción. Los datos de este estudio, correspondientes a los años 2000 a 2003, indican que más de un 50% de todos los lotes analizados estaban por debajo del 10% de PVY lo cual es un valor más que aceptable considerando que la mayoría de los agricultores no realizan medidas especiales de cultivo. En el caso de las producciones tipo 1 que sí llevaron a cabo un manejo especial encaminado a reducir virosis, el porcentaje de lotes por debajo del 10% fue aun mayor, destacando en 2002 donde prácticamente todos estuvieron libres de virosis. Tanto para PVX como para PLRV se obtuvieron mejores resultados para producciones tipo 2, lo cual es de esperar puesto que realizan algunas medidas de las recomendadas para siembra, pero no ocurre lo mismo para PVY donde en 2001 y 2002 se invierten los resultados. Hay que tener en cuenta

que la mayor parte de las medidas más eficaces contra PLRV (transmisión persistente) no lo son tanto para PVY (transmisión no persistente). La siembra tardía y quema de matas son realizadas sólo en producciones tipo 1, por tanto es lógico que no haya muchas diferencias entre las producciones tipo 2 y 3.

Teniendo en cuenta que en las zonas de producción “profesional” de patata de siembra el número de lotes descalificado por sobrepasar el límite de PVY es cada vez mayor, se pueden considerar valores positivos los obtenidos en estos primeros años de programa de análisis de lotes de reemplazo en A Limia. Cuando se considera el total de virosis (PVY+PLRV) para todos los años y agricultores, un 26 % de los lotes cumplirían como certificada B y un 18 % como certificada A.

El virus mayoritario en A Limia también es PVY, con una media global en torno al 15,8 % de infección. Los daños por PVY están bien documentados (Zaag, 1987) pero dependen mucho de la variedad y un buen número de las variedades tienen altos niveles de resistencia. Teniendo en cuenta que no se trata de lotes de patata para certificar y que las dos variedades mayoritarias, Agria y Kennebec, presentaron un buen nivel de tolerancia a PVY como se podrá ver en el Capítulo 2, en esos años se recomendó la siembra de un buen número de lotes con niveles medio/altos de PVY aunque a veces aconsejando fertilización extra en cobertera. Hay que resaltar que la variedad Agria siempre presentó menores porcentajes de PVY que Kennebec que en parte se pueden atribuir a una peor detección de este virus en Agria como se ha comprobado en ensayos de campo con las dos variedades (Couceiro *et al.*, 2005). Dado que la mayoría de las nuevas variedades de patata que salen al mercado presentan un nivel mas que aceptable de resistencia a este virus, desde algunos sectores se plantea la revisión del límite actual en la normativa de producción de patata certificada que está dando lugar a muchas descalificaciones y propiciando el abandono de la producción de patata de siembra en muchas zonas. Pero es un tema polémico, sobre todo por el sinergismo que se produce cuando se presentan varios virus en el mismo lote. Reestman, ya en 1970, ponía de manifiesto que el tema de las pérdidas que producen los virus en patata, hasta ciertos niveles, es bastante controvertido.

PLRV aparece con menos frecuencia que PVY pero es una virosis más grave para las variedades mayoritarias, sobre todo en Kennebec y, por ello, su presencia, aún en pequeños porcentajes, sobre todo cuando va unida a PVY, hace que no se recomiende la siembra. El PLRV puede reducir el rendimiento hasta en un 80% (Zaag, 1987); en

ensayos de campo (Debrot, 1972) se comprobó que con semilla de patata de reemplazo de la variedad “Sebazo” 100% infectada con dicho virus, las plantas provenientes de ellas rindieron un 48,3% menos que las de semilla certificada. En casos de lotes que sólo se descalificarían por PLRV, el aumento de densidad de siembra puede compensar las pérdidas puesto que PLRV da lugar a un peor desarrollo de las plantas, de forma que las plantas adyacentes pueden cubrirlas por completo. También hay algunos trabajos antiguos que indican que el abonado nitrogenado puede reducir la sintomatología (Wilson, 1955; Watson y Wilson, 1956), que deberían actualizarse. Los pocos lotes analizados de la variedad Desiree presentaban en general valores muy altos de las dos virosis principales y también de PVX, virus que sólo se analizó un año una vez comprobado que aparece sólo ocasionalmente (3,7%) en las producciones tipo 3 y que un 90% de los lotes tienen menos del 10%. Este virus produce daños menores cuando es el único presente pero puede dar lugar a daños graves en caso de aparecer junto a los otros dos; además, como se transmite mecánicamente puede causar problemas graves al persistir en el terreno o por ser llevados a otras parcelas con la maquinaria.

La recogida de datos de poblaciones de pulgones, habitual en las zonas de producción de patata de siembra, puede ser valiosa para, en base a los picos de muchos años, estimar los momentos oportunos de intervención. Por los datos recogidos en varias zonas y años, las poblaciones son muy irregulares y en todo caso no parece que haya una relación clara entre los niveles de población de un verano y el nivel de virosis en los lotes analizados en invierno (Pérez *et al.*, 2004).

Las recomendaciones realizadas a los agricultores pretenden reducir las pérdidas que se producen habitualmente por el reemplazo y, en muchos casos, la recomendación de no sembrar está encaminada a evitar un aumento de patógenos no sólo en las parcelas del agricultor concreto sino en toda la comarca. No hay datos sobre el cumplimiento de lo que no son más que “sugerencias de manejo”, pero el hecho de que los agricultores sigan llevando lotes a analizar y que cada año nuevos agricultores se incorporen al programa, soliciten este servicio de otros laboratorios o incluso se animen a utilizar kits de autoanálisis, parece indicar que lo valoran positivamente por haber mejorado sus rendimientos y reducido sus costes.

Aunque hay estimaciones de lo que se “reserva” para reemplazo (Tabla 1.3), no hay datos precisos y es difícil cuantificar el ahorro que supone a los agricultores el reemplazo con patata de calidad aceptable pues es muy variable de un año a otro y para distintas

variedades, pero parece claro que aquellos que cultivan superficies elevadas pueden disminuir los costes de producción considerablemente produciendo su propia siembra y, por tanto, obtener mayores rendimientos de sus cosechas como quedó patente en el estudio económico resumido en la Justificación y Objetivos de esta tesis doctoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alonso, F. 2002. El cultivo de la patata, 2nd ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Andrade, N., Contreras, A. y Castro, I. 2008. Evaluación comparativa del efecto en el rendimiento y sanidad en el cultivo de la papa al utilizar semilla certificada y sin certificar. *Agro Sur* 36(2): 111-114.
- Cabaleiro, C., García Calvo, L., y Alvarez Pousa, S. 2000. Virosis en el cultivo de la patata en Xinzo de Limia. Patata 2000, Congreso Iberoamericano sobre Investigación y Desarrollo en patata. Vitoria-Gasteiz, 2-6 Julio 2000.
- Couceiro, C. García-Calvo, L., Alvarez, S. y Cabaleiro, C. 2005. Optimization of direct immunoprinting for the detection por potato viruses. 16th triennial conference of the EAPR. Bilbao, 17-22Julio
- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. *Journal General Virology*. 34: 475-483.
- Debrot, E. A. 1972. El virus del enrollamiento de las hojas de la papa (PLRV) en Venezuela. VIII Jornadas Agronómicas. Cagua, Edo. Aragua, 21-24 de junio.
- Ellisèche, D., Merlet, J., Le Hingrat, Y., Groau, G. y Langlade, P. 1999. Producción de patata de siembra. En: Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (Eds.). *La Patata*. Mundi Prensa, Madrid. 423-456.
- Gildemacher, P., Demo, P., Kinyae, P., Nyongesa, M. y Mundia, P. 2007. Selecting the best plants to improve seed potato. *LEISA Magazine* 23(2): 10–11.
- Gudmestad, N.C. 1991. A historical perspective to pathogen testing in seed potato certification. *American Journal of Potato Research* 68: 99-102.
- Handizi, A. y Legorburu, F.J. 2002. Escaping from potato virus Y: aphid repellents and planting dates. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleber, Germany: 156.

- Martínez-Beringola, M.L., Franco, L., Pazvivas, L.M. y Gutierrez, M.P. 1987. Distribución en España de *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*. Nematología mediterranea 15:183-191.
- Mateos, C. 2009. El privilegio del agricultor: Un derecho irrenunciable. Jornadas Protección Obtenciones Vegetales. Entrada el 18/11/2009, consultado el 11/04/2012. URL: <http://cronicaeconomica.com/articulo.asp?idarticulo=14669>
- Mendoza, H.A., Fernandez, E., Jayasinghe, U., L.F. Salazar, L.F., Chuquillanqui, C., Galvez, R. 1989. Breeding for resistance to potato viruses Y, X, and leafroll: research strategy, selection procedures and experimental results. In: Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato. Report of the III Planning Conference. International Potato Center, Lima (Peru). November 20–22: 155-171.
- Pérez, P., García-Calvo, L., Martín, B. y Cabaleiro, C. 2004. Actividad de las potenciales especies vectoras de virosis de patata en la zona de producción de Xinzo de Limia (Orense). Bol. San. Veg. Plagas, 30: 487-496.
- Popkova, K., Konstenko, V. y Yu, N. 1981. Silver scurf of potato and its harmfulness under conditions in the Moscow district. Izv. Timiryazevsk. S-kh. Akad., 3, 97-101. Citado por: Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (Eds). La patata. Mundi-Prensa, Madrid.
- Quintas, T. 2000. A pataca de semente na Limia. Revista do Instituto do Campo, 2: 6-8.
- Reestman, A.J. 1970. Importance of the degree of virus infection for the production of ware potatoes. Potato Research 13(4): 248–268.
- Ríos, L. 2007. ASAJA-Valladolid denuncia el “abuso” del precio de la semilla de patata y cifra la subida en un 100%. Entrada el 19/04/ 2007, consultado el 11/04/2012. URL: <http://www.agrocope.com/noticias.php?id=77624&comu=&ztipo=&ini=0&ini2=5310>
- Rosende, O., García-Calvo, L. y Cabaleiro, C. 2003. Nematodos del género *Globodera* y alternativas de control en Galicia. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas, 29: 63-69.
- Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (Eds). 1999. La patata. Mundi- Prensa, Madrid.
- Salazar L.F. 2003. Potato viruses after the XXth century: Effects, dissemination and their control. Entrada el 3/12/2003, consultado el 11/04/2012. URL: http://www.crawfordfund.org/assets/files/awards/Potato_Viruses_after_the_20th_Century.pdf
- Solomon, R.M. y Barker, H. 2001. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. Heredity 86: 17–35.

- Watson, D.J. y J.H. Wilson. 1956. An analysis of the effects of infection with leafroll virus on the growth and yield of potato plants, and of its interactions with nutrient supply and shading. *Annals of Applied Biology*, 44(3): 390–409.
- Wilson, J.H. 1955. Effects of nutrition and light intensity on symptoms of leafroll virus infection in the potato plant. *Annals of Applied Biology*, 43(2): 273–287.
- Zaag, D. E. Van der, 1987. Yield reduction relation to virus infection. En: J.A. De Bokx y J.P.H. Van der Want (Eds). *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Pudoc, Wageningen; 2nd ed. 146-150.

CAPITULO 2

CAPITULO 2: Influencia de la utilización de lotes de reemplazo en la producción de patata

RESUMEN

Aunque sólo el empleo de patata certificada garantiza que el nivel de virosis graves y otros patógenos esté por debajo del umbral económico de daños, muchos agricultores reemplazan para la siembra partidas de patata de consumo o dedican cierta superficie a la producción de su propia patata de siembra. Esta práctica tiene como objetivo principal disminuir los costes de producción pero en ocasiones se hace porque cuando una variedad deja de estar protegida disminuye la cantidad de patata certificada disponible en el mercado o su calidad. De algunas variedades tradicionales como la Fina de Carballo, de uso minoritario pero muy valoradas en el mercado local, apenas hay material certificado.

En 2008 y 2011 se establecieron parcelas de ensayo en fincas de agricultores y del Centro Tecnológico da Carne (CTC) sembradas con lotes de tubérculos de las variedades mayoritarias Agria y Kennebec que habían sido enviados por agricultores para valorar su calidad de cara al reemplazo. Ese material se analizó para PVY y PLRV, se valoraron *de visu* los síntomas/signos de patógenos y otros daños y se calificaron según dos escalas: una de 3 puntos para estado general de tubérculos y otra de 5 puntos de “recomendación de siembra” en función, entre otros parámetros, del nivel de virosis. En 2009 y 2010 se establecieron ensayos para determinar los daños producidos por niveles medio- altos de PVY y PLRV en la variedad Fina de Carballo.

Aunque casi siempre hubo un efecto significativo del nivel de virosis en la producción bruta y comercial de tubérculos de patata, la variabilidad fue muy alta y éste no se manifestó hasta niveles relativamente elevados. La variedad Kennebec tuvo un mejor comportamiento que la Agria. La escala de recomendación de siembra utilizada permite descartar los lotes que podrían producir mayores pérdidas de producción (recomendación de “no sembrar”) pero en los lotes en los que se recomendó tratar o seleccionar tubérculos no se detectaron diferencias significativas en los niveles de producción alcanzados por los lotes de reemplazo. La variedad Fina de Carballo presentó una excelente tolerancia al PVY y, en menor medida a PLRV, sin que se produzcan descensos significativos de producción incluso en lotes con el 60 y el 100% de estos virus, en ninguno de los años evaluados.

Palabras clave: patata, virus, PVY, PLRV, Fina de Carballo, Kennebec, Agria, siembra

INTRODUCCION

Los virus en patata reducen el vigor de las plantas y la posibilidad de utilizar los tubérculos como semilla porque se perpetúan en los tubérculos; además, las plantas de patata pueden ser portadoras de virus sin presentar síntomas, especialmente cuando los han adquirido al final del ciclo vegetativo (Zaag, 1987; Alonso, 2002; Johnson, 2007). En muchos casos, los síntomas de diferentes virosis en la planta de patata son similares

y a menudo pueden ser diagnosticados por mosaicos sobre las hojas, atrofia de las plantas, malformaciones de hojas y malformaciones de tubérculos no específicas; de hecho, la nomenclatura de la mayoría de virus de la patata no sigue las normas que rigen para la mayoría de los virus vegetales, “Huésped-Síntomas-Virus” (Hull, 2002), entre otros motivos por esa inespecificidad de los síntomas que impide dar una “segunda letra” identificativa (PVA, PVY, PVX, PVA, PVM...) (Singh *et al.*, 2008). Esto no ocurre, por ejemplo, en el PLRV (*Potato leafroll virus* en alusión a los claros síntomas de hojas enrolladas), único virus, de los principales que se nombra con las sigla del cultivo y los síntomas. Los síntomas y daños no siempre se expresan claramente debido a interacciones entre el/los virus, a la variedad de patata, a las condiciones de cultivo (ambientales y de fertilidad del suelo) y también a la edad de la planta cuando es infectada y la forma en la que se haya transmitido el/los virus (Cervera y García, 1996). Los tubérculos infectados dan lugar, una vez sembrados, a plantas con una expresión de síntomas algo más clara y por ello, aunque los virus se pueden transmitir de muchas maneras diferentes, el tubérculo “semilla”, es la vía más importante de propagación (Johnson, 2007). El número de virus vegetales que se transmiten por semilla-tubérculo de patata es muy alto (Tabla 6)). En la patata de siembra, los virus son sólo uno de los grupos de patógenos que se evalúan y, para muchas variedades –con buenos niveles de resistencia –, quizá no el más importante; pero se han convertido en el factor básico “objetivo” para el descarte de lotes, pues al no producir síntomas en el tubérculo no es posible una selección previa por parte de los agricultores y es la prueba serológica la que determina la clasificación.

Las dos variedades más cultivadas en A Limia, Kennebec y Agria, se considera que tienen un buen nivel de resistencia a PVY (8 sobre 10) y, sobre todo Kennebec, son sensibles a PLRV, lo cual ha sido tenido en cuenta cuando se establecen los umbrales para la utilización o no o en qué condiciones de la patata de reemplazo (Capítulo 1). De las variedades tradicionales recuperadas o en intento de recuperación en Galicia (García-Calvo, 2002): Fina de Carballo, Cazona de Vilalba, Ganade de A Limia y Habanera de O Valadouro, sólo de la Fina hay un cultivo medianamente consolidado en la comarca de Bergantiños. Dado que de esta variedad apenas hay patata de siembra certificada, casi todo lo que se siembra es reemplazo y el nivel de infección por PVY es muy alto porque, como en la mayoría de zonas de cultivo de patata, en Galicia el PVY está ampliamente distribuido (Cabaleiro *et al.*, 2000). Como, en su zona y circunstancias, el cultivo sigue siendo rentable, esta variedad debe tener una buena

tolerancia a ese virus, pero no se ha evaluado. La Xunta de Galicia lleva un tiempo intentando la recuperación del cultivo y para ello se ha encargado su saneamiento al centro tecnológico NEIKER (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario), que cada año produce pequeñas cantidades (4.625 kg en la campaña 2010/11) que se utilizan en ensayos y para su propagación por parte de agricultores o asociaciones y grupos de desarrollo que, por ejemplo, en 2012 sembraron 450 kg procedentes de la multiplicación del material saneado entregado desde el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Para los ensayos en 2009 y 2010, por tanto, se disponía de material libre de virus para comparar con el material de reemplazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos en 2008 y 2011: Agria y Kennebec

Los ensayos se llevaron a cabo en 2008 (38 lotes) y en 2011 (41 lotes) en una parcela experimental de la Xunta de Galicia gestionada por el CTC en Laguna de Antela (concello 78 Parcela nº71 pol. 177), Sandiás (Ourense). Se marcaron dos líneas de siembra de unos 240 m de longitud y de cuatro surcos cada una. Estas líneas se dividieron en parcelas de 2,5 m de largo por los 4 surcos, dejando un pasillo de 1,5 m entre cada una de ellas. Las patatas se sembraron a mano a 30 cm de separación entre ellas (8 patatas por surco y 32 patatas por parcela). El diseño fue en bloques al azar con tres repeticiones por lote de siembra. Cada lote de siembra fue analizado por DIP ELISA (según el protocolo propuesto en el Capítulo 3) para detectar la presencia de PVY y PLRV. Se evaluó también la presencia de síntomas de otros patógenos y fisiopatías en base una escala de 3 puntos en función de la presencia o no de esclerocios de *Rhizoctonia*, daños mecánicos, sarnas etc donde: 1 = sin daños; 2 = daños o patógenos presentes; 3 = dañadas y con patógenos. También se clasificaron a nivel global (considerando virus y otros daños) los resultados de producción en función de la escala de recomendación de 5 puntos (donde 1 = “sembrar” y 5 = “no sembrar”) propuesta en el Capítulo 1. Se analizaron un mínimo de 20 patatas por lote (50 de media, dependiendo del tamaño del lote). Con todos los datos se hizo también una “estimación de pérdidas” en caso de siembra.

La siembra se realizó el 3 de Mayo en 2008 y el 10 de mayo en 2011 y las parcelas se cosecharon el 6 de septiembre de 2008 y el 16 de septiembre de 2011,

respectivamente; se tomaron todos los tubérculos de los dos surcos centrales de todas las parcelas para estimar producciones brutas (PB) por ha ($P \text{ muestra} \times 10.000 / (2.5 \times 1.5)$) y producciones comerciales (PC) por ha en función del calibre (entre 40 y 80 mm).

A lo largo del desarrollo del cultivo se tomaron datos de diferentes observaciones tales como: marras, desarrollo, heterogeneidad de las plantas y síntomas de virosis; además, en 2011, a medio ciclo (Julio) se realizaron mediciones de nivel de clorofila con un Fluorímetro Opti-sciences CCM 20 (Tyngsboro, MA, USA), con 10 medidas por parcela (30 por lote).

Un primer análisis estadístico de los datos de producción indica que no hay diferencias significativas entre repeticiones de los mismos lotes ($p=0,257$ en 2008 y $p=0,498$ en 2011) y sí diferencias entre variedades en 2008 ($p=0,038$) aunque no en 2011 ($p=0,298$) de ahí que se estudien los datos de Agria y Kennebec por separado.

Los datos de porcentaje de virosis en siembra (PVY, PLRV y suma de ambos) y otros parámetros medidos para obtener una calificación de lotes de siembra se representan gráficamente frente a los correspondientes valores de producción por ha (según se indica en Capítulo 1) y se calcula el nivel de correlación y la significación estadística de dicha correlación utilizando el coeficiente de Spearman ρ (ro) que es una medida de la asociación o interdependencia entre dos variables aleatorias continuas (McDonald, 2009; Wessa, 2012). El coeficiente de Spearman oscila entre -1 y +1, indicando asociaciones negativas o positivas respectivamente. Los análisis se realizan con el software de acceso libre disponible en la web de P. Wessa (www.wessa.net/rwasp_spearman.wasp/).

Ensayos en 2009 y 2010: Fina de Carballo

La variedad Fina de Carballo es una variedad de ciclo tardío, con gran desarrollo foliar, poco productiva (en secano no supera las $20 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) y con bajo porcentaje de tubérculos de calibre comercial, de piel amarilla y carne muy blanca, redondos y con ojos bastante profundos (García-Calvo, 2002). En 2009 se estableció un ensayo con tres repeticiones en bloques al azar en una finca en Cardeita (Sandiás, Ourense) del agricultor colaborador Manuel Cid Quintas (concello 78 pol 502 parcela 1071). En 2010 se repitió el ensayo, con modificaciones, en la mencionada finca de la Xunta de Galicia gestionada por el CTC en Laguna de Antela. Las parcelas experimentales fueron de $4,5 \text{ m}^2$. En 2009 los tipos de semilla comparados fueron lotes con 0, 20, 40 y 100% de

PVY, todos ellos seleccionados entre el material cultivado a partir del que la Conselleria de Medio Rural recibía de NEIKER tras el saneamiento y primeras multiplicaciones; se incluyó también patata de consumo de la misma variedad, equivalente al que utilizan los agricultores, con alto nivel de virosis. En 2010 se compararon lotes de semilla con 100% PVY o PLRV con lotes de patatas libres de uno o de los dos virus. Se tomaron datos de producción (según calibres), se analizó materia seca y presencia de otros daños (daños mecánicos, verdeo, agusanado, etc.).

Los datos se analizaron mediante un Modelo Lineal General (MLG) univariante, con el programa PASW Statistics 18 y la comparación de medias se hizo mediante el test de Tuckey-b.

RESULTADOS

Ensayos en 2008 y 2011: Agria y Kennebec

La observación a media estación de las parcelas con los diferentes lotes con distintos niveles de virosis no evidenció diferencias importantes, aunque a principios del verano, se distinguían algunos lotes por su menor desarrollo y coloración más clara. Las medidas del nivel de clorofila realizadas a medio ciclo no reflejaron el nivel de virosis inicial de los lotes y la mayoría de medidas oscilaron entre los 40 y 50 CCI (chlorophyl content index), tanto en Agria como en Kennebec.

En las Tablas 2.1 y 2.2 se presentan los resultados de los análisis de los lotes a evaluar y las producciones ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) medias (\pm desviación típica) obtenidas en las parcelas de cada lote en los dos años de estudio. Además, se incluye la escala de Recomendación de siembra utilizada en el Capítulo 1 y las pérdidas esperadas en caso de siembra del lote, además de las pérdidas reales respecto a los testigos con patata certificada de la misma variedad. La variabilidad entre producciones del mismo lote fue muy alta (dt media $4500 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) y las pérdidas respecto al control con patata certificada normalmente son mayores que las estimadas pero hay casos en los que la producción superó al testigo incluso cuando tienen niveles de virosis y otros patógenos altos. En general hubo una correlación significativa ($p < 0,001$) entre las pérdidas estimadas y las reales de las dos variedades respecto a los lotes certificados en 2008 pero no en 2011. Como media, los lotes clasificados como “no sembrar” o sembrar con algún tipo de tratamiento (2, 3, 4 y 5) tuvieron producciones comerciales un 10% inferiores a las del control.

Tabla 2.1 Resultado del análisis serológico del material vegetal de partida (PVY y PLRV y suma de ambos, ΣV) de los lotes a evaluar y producciones medias bruta (PB) y comercial (PC) ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\pm\text{dt}$) obtenidas en las tres parcelas de cada lote en 2008; recomendación (Rec) y pérdidas estimadas en función de calidad de lote (PE%); además se incluyen las pérdidas respecto a la PB o PC de las parcelas testigo de cada variedad (PBT% y PCT%)

Lote	PVY %	PLRV %	ΣV %	PB Kg/ha	$\pm\text{dt}$	PC kg/ha	$\pm\text{dt}$	Rec	PE %	PBT %	PCT %
A-cert	0	0	0	60148,1	2699,9	52908,1	2374,9	1	0	-	-
A-P59	11	7	18	43044,4	2526,6	41159,3	2415,9	4	15	28,4	22,2
A-P64	10	0	10	62666,7	9879,6	49195,0	7755,7	2	5	-4,2	7
A-P82	0	1	1	64474,1	5868,1	63055,1	5738,9	2	3	-7,2	-19,2
A-P83	2	3	5	64637,0	4506,7	50438,4	3516,8	2	5	-7,5	4,7
A-P85	1	1	2	61466,7	2151,4	57489,1	2012,2	1	2	-2,2	-8,7
A-P89	10	0	10	50111,1	2685,0	43965,4	2355,7	2	8	16,7	16,9
A-P91	0	0	0	55229,6	2575,6	49128,4	2291,1	1	1	8,2	7,1
A-P93	10	5	15	45066,7	1361,9	40803,6	1233,1	2	15	25,1	22,9
A-P97	15	4	19	56570,4	2531,2	53164,1	2378,8	2	15	5,9	-0,5
A-P98	5	11	16	47540,7	4741,7	47466,1	4734,3	3	15	21,0	10,3
A-P99	0	38	38	56088,9	8106,8	51971,2	7511,7	5	30	6,7	1,8
A-P102	22	7	29	44088,9	2595,7	43088,8	2536,8	3	15	26,7	16,6
A-P104	10	0	10	66770,4	3666,4	62440,3	3428,6	4	5	-11,0	-18
A-P114	3	3	6	46311,1	1833,0	43262,6	1712,4	1	4	23,0	15,2
A-P118	26	7	33	50829,6	4747,3	49461,3	4619,5	4	5	15,5	6,5
A-P123	2	5	7	60600,0	8852,4	52162,5	7619,9	1	4	-0,8	1,4
A-P124	3	3	6	53444,4	8745,5	52326,6	8562,6	5	25	11,1	1,1
A-P120	34	8	42	45555,6	3840,8	28538,4	2406,1	5	30	24,3	46,1
K-cert	0	0	0	48185,2	5208,8	46814,3	5060,6	1	0	-	-
K-P60	35	7	42	33792,6	3138,4	23341,3	2167,8	5	25	29,9	50,1
K-P63	36	13	49	39992,6	1760,5	37856,2	1666,5	5	35	17,0	19,1
K-P86	52	2	54	42896,3	2021,7	37692,9	1776,4	5	25	11,0	19,5
K-P87	55	0	55	48911,1	4334,6	45208,2	4006,4	5	25	-1,5	3,4
K-P90	30	0	30	38933,3	4822,8	34537,6	4278,3	4	15	19,2	26,2
K-P92	6	26	32	34844,4	6383,5	30617,8	5609,1	5	20	27,7	34,6
K-P100	20	0	20	57688,9	3506,0	41325,2	2511,5	4	10	-19,7	11,7
K-P101	44	28	72	33400,0	8755,5	30901,8	8100,6	5	50	30,7	34
K-P103	15	5	20	55177,8	7214,2	48561,2	6349,1	2	10	-14,5	-3,7
K-P106	22	22	44	46311,1	7703,5	43375,6	7215,2	5	25	3,9	7,3
K-P108	0	0	0	50051,9	2087,3	40858,7	1703,9	2	3	-3,9	12,7
K-P109	5	0	5	60355,6	4466,8	55318,6	4094,1	4	3	-25,3	-18,2
K-P110	5	5	10	53155,6	8737,0	44001,4	7232,4	4	8	-10,3	6
K-P115	0	6	6	59200,0	3420,5	50489,1	2917,2	5	5	-22,9	-7,8
K-P116	66	0	66	51718,5	6278,5	47929,5	5818,5	5	30	-7,3	-2,4
K-P117	17	0	17	55074,1	2143,5	41529,8	1616,4	4	10	-14,3	11,3
K-P122	31	5	36	38281,5	10841,2	35565,9	10072,1	5	25	20,6	24

A: Agria; K: Kennebec; en negrita, parcelas testigo con patata certificada

Tabla 2.2 Resultado del análisis serológico del material vegetal de partida (PVY y PLRV y suma de ambos, ΣV) de los lotes a evaluar y producciones media bruta (PB) y comercial (PC) (kg/ha \pm dt) obtenidas de las tres parcelas de cada lote en 2011; recomendación (Rec)) y pérdidas estimadas en función de calidad de lote (PE%); además se incluyen las pérdidas respecto a la PB o PC de las parcelas testigo de cada variedad (PBT% y PCT%).

Lote	PVY %	PLRV %	ΣV %	PB Kg/ha	\pm dt	PC kg/ha	\pm dt	Rec	PE %	PPT %	PPC %
A-cert	0,0	0,0	0,0	80438,5	11090,1	74106,6	10036,8	1	0		
A-4	0,0	0,0	0,0	62186,7	14106,7	52771,1	4505,1	4	0	28,0	33,1
A-6	8,0	4,0	12,0	78311,1	18539,5	59404,0	25443,0	2	8	9,4	24,6
A-8	5,7	5,7	11,4	85360,0	4563,2	60514,6	1113,3	2	8	1,2	23,2
A-9	0,0	2,3	2,3	73955,6	11057,2	54716,9	7809,8	2	1	14,4	30,6
A-14	13,2	0,0	13,2	63448,9	10878,7	51056,2	14545,7	4	6	26,6	35,2
A-15	4,8	2,4	7,1	81600,0	7335,2	67260,8	3122,7	4	3	5,6	14,7
A-16	2,1	0,0	2,1	95217,8	5524,4	79276,4	9326,7	1	0	-10,2	-0,6
A-19	5,7	2,9	8,6	56160,0	19984,9	50764,4	16966,9	5	25	35,0	35,6
A-20	2,9	2,9	5,9	88302,2	3818,6	76062,8	6342,5	4	4	-2,2	3,5
A-21	5,4	0,0	5,4	67306,7	17229,8	41837,6	13993,6	2	2	22,1	46,9
A-23	40,0	6,7	46,7	58524,4	16378,3	46074,4	13596,4	5	25	32,3	41,6
A-26	25,7	5,7	31,4	69884,4	6575,7	44162,7	5864,2	4	20	19,1	44,0
A-27	4,5	9,1	13,6	53253,3	26964,3	36750,8	4830,7	1	5	38,4	53,4
A-30	0,0	4,0	4,0	81066,7		77013,3		3	2	6,2	2,3
A-31	0,0	3,2	3,2	80462,2	6350,3	65591,0	4820,9	1	1	6,9	16,8
A-32	0,0	3,1	3,1	71608,9	1786,7	54810,3	8521,5	1	2	17,1	30,5
A-33	3,4	3,4	6,9	84604,4	3647,5	75015,9	18470,1	3	5	2,1	4,8
A-36	5,3	10,5	15,8	72017,8	4160,8	61084,4	6998,7	3	12	16,7	22,5
A-37	8,3	0,0	8,3	77048,9	7069,3	62337,3	2784,3	4	4	10,8	20,9
A-39	0,0	0,0	0,0	88320,0	528,0	64028,0	7554,2	1	0	-2,2	18,8
K-12	0,0	0,0	0,0	69706,7	16356,6	54449,3	11868,3	1	0		
K-5	32,3	0,0	32,3	69973,3		62556,2		4	20	-0,4	-14,9
K-7	0,0	0,0	0,0	58968,9	13410,2	45739,8	19249,9	3	2	15,4	16,0
K-11	41,7	5,6	47,2	68675,6	18515,4	50424,0	28160,6	5	30	1,5	7,4
K-17	5,6	2,8	8,3	61475,6	13315,4	44224,3	4181,6	2	5	11,8	18,8
K-18	6,8	0,0	6,8	77564,4	11216,8	56230,0	3981,2	2	2	-11,3	-3,3
K-24	18,6	7,0	25,6	64266,7	1206,8	60348,2	2647,0	4	15	7,8	-10,8

A: Agria; K: Kennebec; En negrita, parcelas testigo con patata certificada

Los lotes clasificados como 3 según la escala descrita en el capítulo 1, dieron menores producciones independientemente del nivel de virosis en las 2 variedades en 2008 (Figura 2.1) y también en Agria en 2011 pero para Kennebec en este año las diferencias no fueron significativas (Figura 2.2).

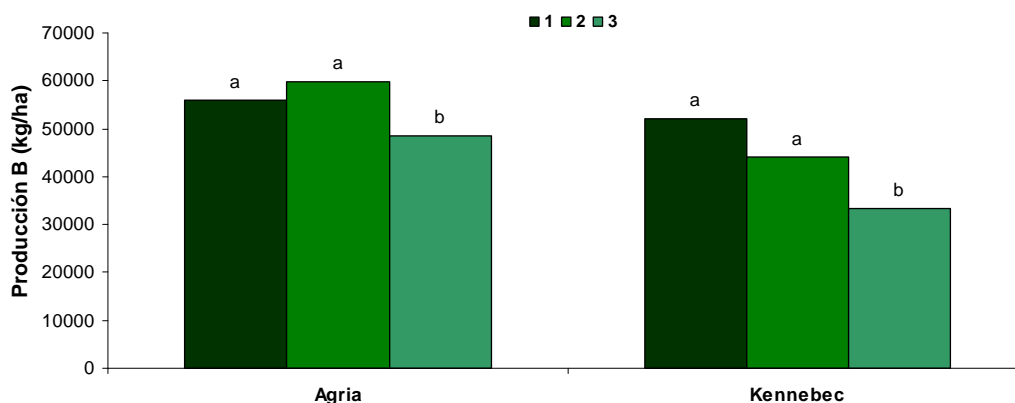


Figura 2.1 Efecto del estado sanitario de la semilla (sin tener en cuenta virosis) en la producción bruta media de los lotes de re-emplazo de Agria y Kennebec en 2008. 1: óptimo para siembra; 2: gromo en mal estado, daños leves o presencia de síntomas de micosis; 3: gromo en mal estado, daños importantes o presencia de signos de hongos. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,005$ según el test de Tuckey b.

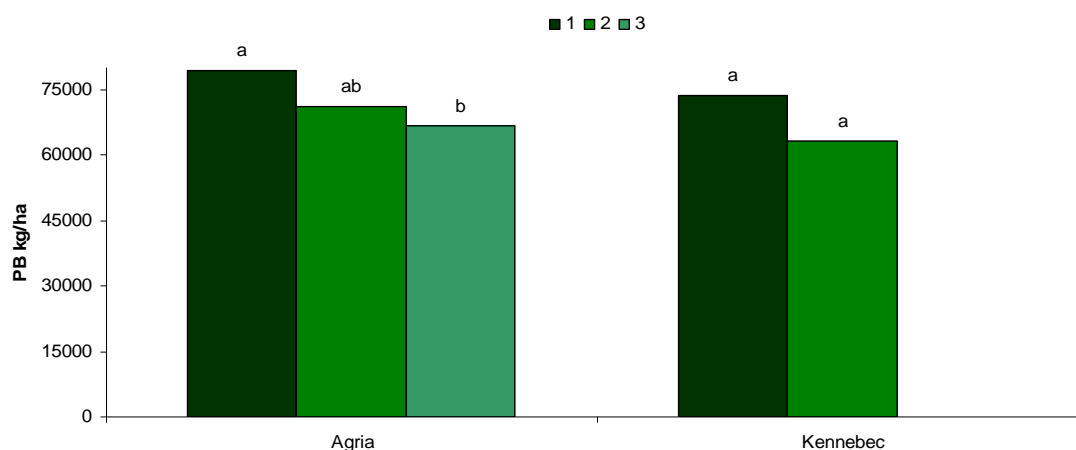


Figura 2.2 Efecto del estado sanitario de la semilla (sin tener en cuenta virosis) en la producción bruta media de los lotes de re-emplazo de Agria y Kennebec en 2011. 1: óptimo para siembra; 2: gromo en mal estado, daños leves o presencia de síntomas de micosis; 3: gromo en mal estado, daños importantes o presencia de signos de hongos; este año no hubo lotes de Kennebec con calificación 3. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey b.

Cuando se utiliza la escala de recomendación de siembra propuesta en el Capítulo 1 que incluye el nivel de virosis como factor de clasificación además del estado sanitario general, los resultados son poco claros en 2008 y las diferencias de producción observadas, tanto en Kennebec como en Agria, no se corresponden con la recomendación de siembra, aunque la producción de los lotes a no sembrar fue menor, especialmente en Kennebec (Fig. 2.3). En 2011 sí hay un descenso de producción importante entre los lotes a sembrar sin problemas y aquellos que se recomendó no sembrar, con una media de 14000 kg menos por ha (Fig. 2.4); todavía menos clara fue la influencia de otros daños.

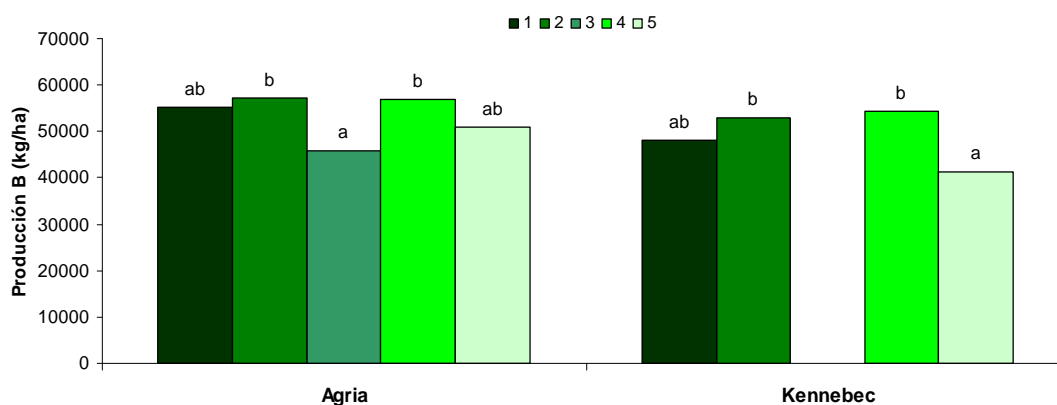


Figura 2.3 Escala de recomendación de siembra y producción bruta media conseguida en las parcelas sembradas con los lotes correspondientes en 2008 (Agria y Kennebec). Letra diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey-b. 1: sembrar; 2: sembrar tratando; 3: sembrar escogiendo; 4: sembrar tratando y escogiendo; 5: no sembrar. En 2008 no hubo lotes de Kennebec en el grupo 3.

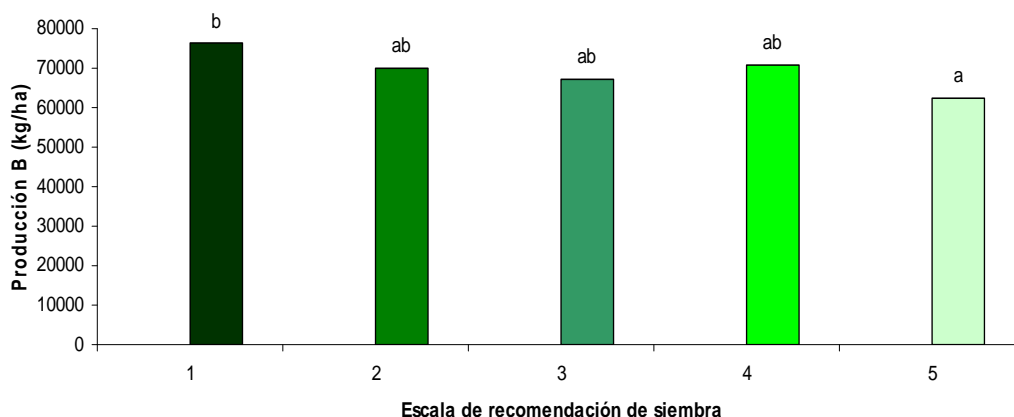


Figura 2.4 Escala de recomendación de siembra y producción bruta media conseguida en las parcelas sembradas con los lotes correspondientes en 2011 (global para Agria y Kennebec). Letra diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey-b. 1: sembrar; 2: sembrar tratando; 3: sembrar escogiendo; 4: sembrar tratando y escogiendo; 5: no sembrar.

En las figuras 2.5 a 2.16 se representan las correspondencias entre nivel de virosis (PVY, PLRV y suma de ambos) y las producciones alcanzadas para cada una de las variedades en los dos años de estudio. En 2008 se puede ver por las pendientes negativas de las rectas de regresión lineal, que a medida que aumenta el nivel de virosis inicial en la patata de siembra, disminuye la producción en todos los casos pero esa disminución es muy progresiva, sobre todo para PVY y sólo cuando los dos virus están presentes las pérdidas alcanzaron valores importantes. Para tener una visión global de todos los lotes y sus repeticiones se optó por hacer, además de los análisis de datos por escalas, un estudio de correlación, utilizando el coeficiente de Spearman. En la tabla 2.3 se presentan los resultados de dicho análisis y los niveles de significación del mismo. En 2008 la correlación entre nivel de virosis y producción fue siempre significativa y en 2011 sólo en algunos casos en Agria pero no en Kennebec.

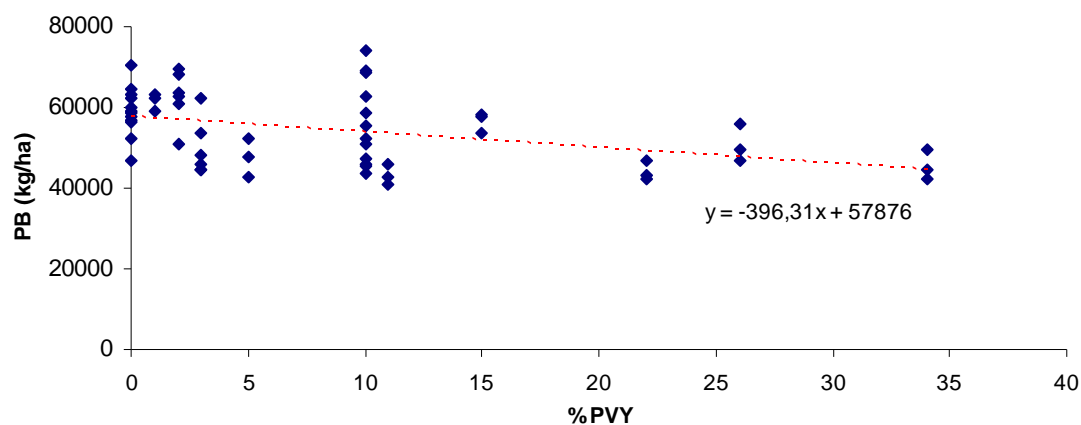


Figura 2.5 Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

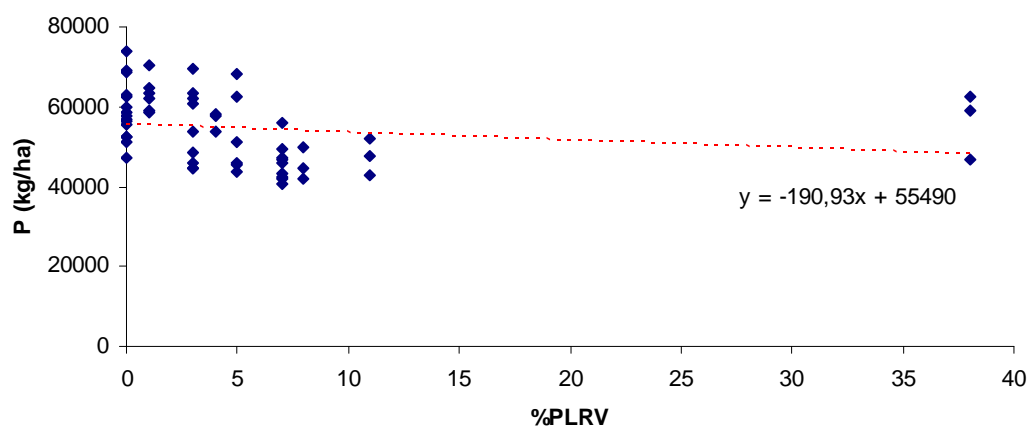


Figura 2.6 Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

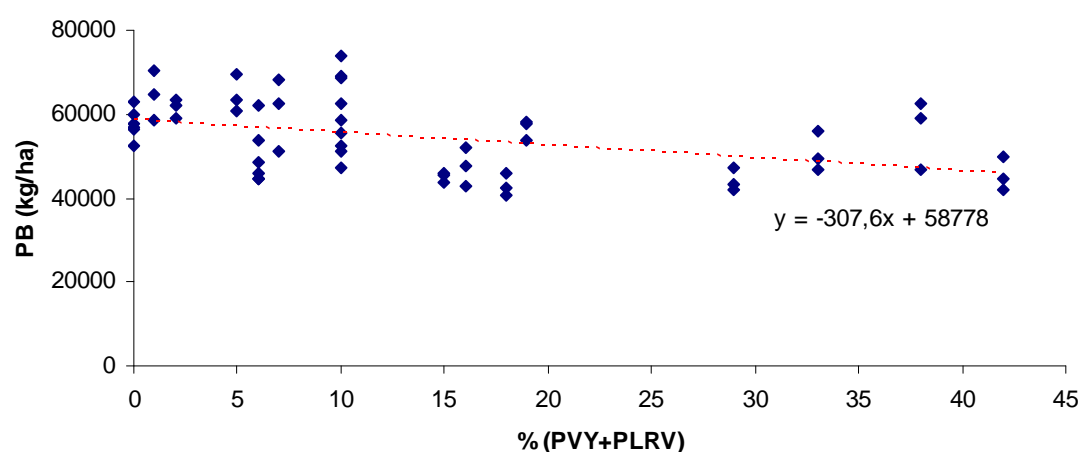


Figura 2.7 Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

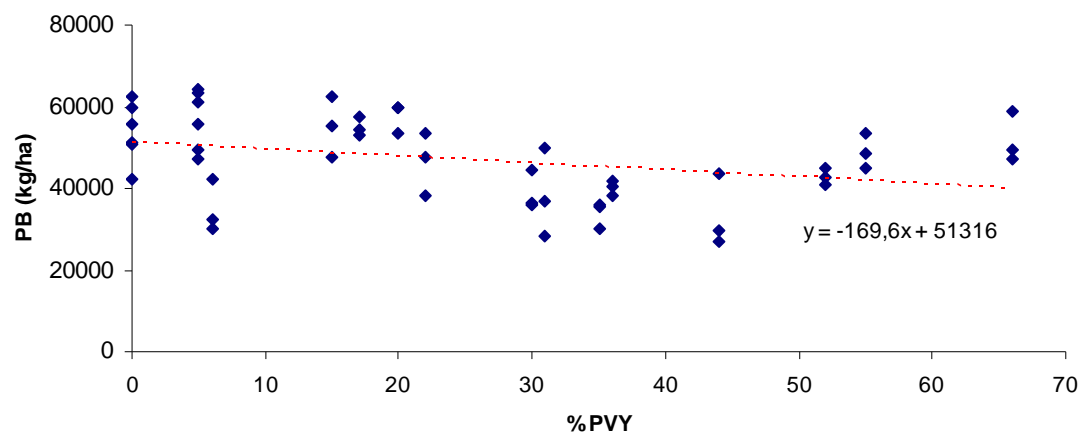


Figura 2.8 Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

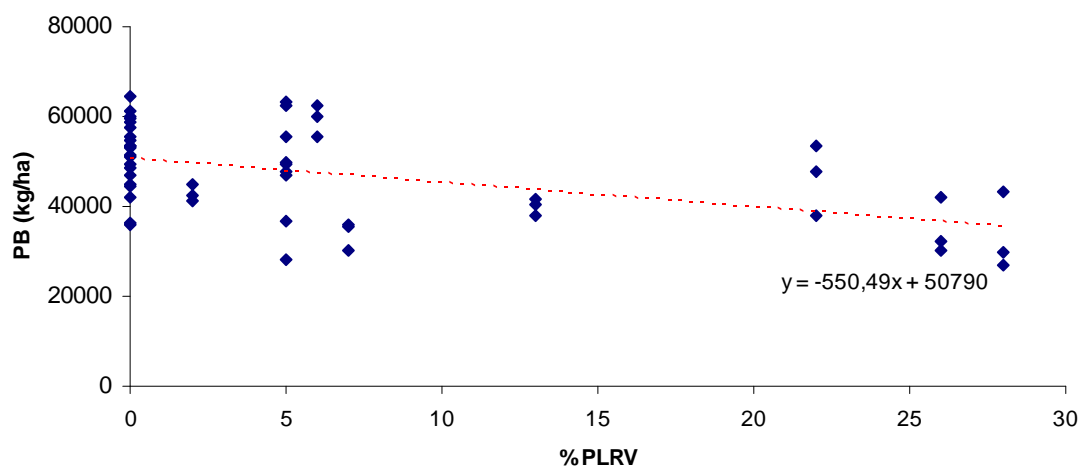


Figura 2.9 Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

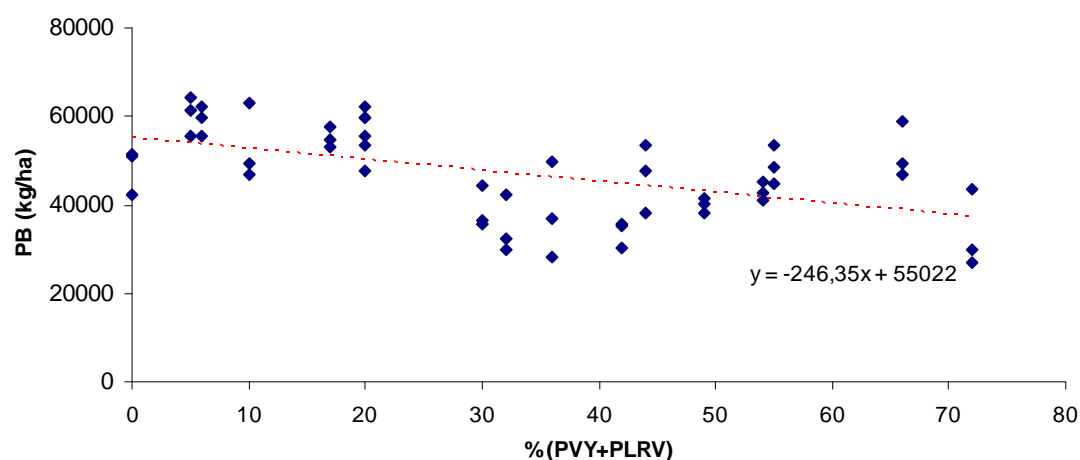


Figura 2.10 Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2008 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

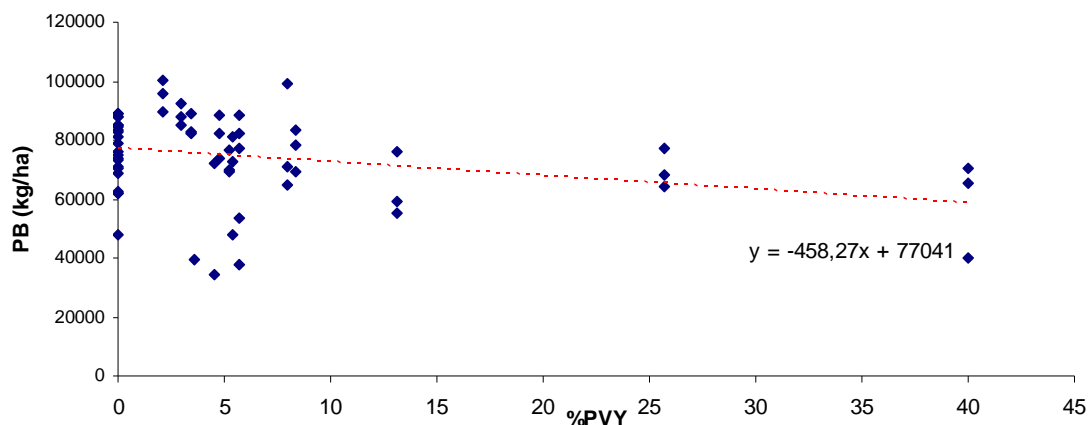


Figura 2.11 Porcentaje de PVY frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

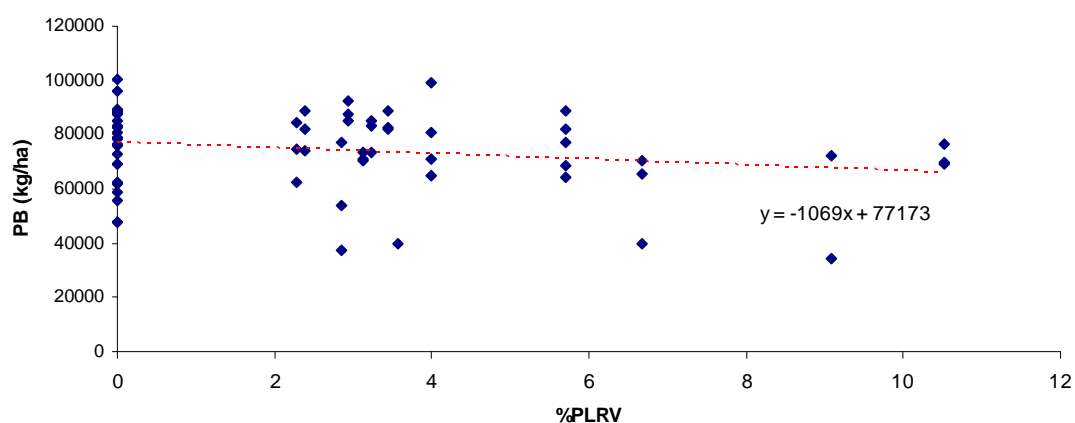


Figura 2.12 Porcentaje de PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

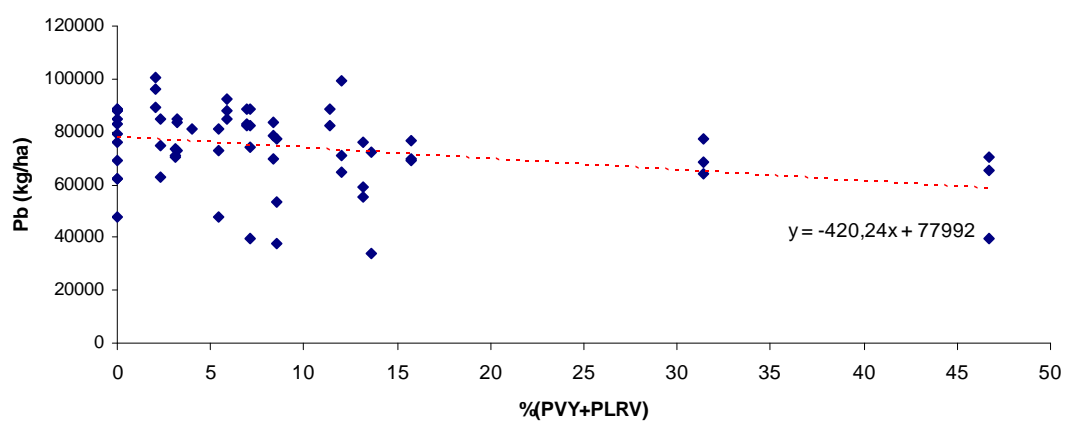


Figura 2.13 Porcentaje de PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Agria en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

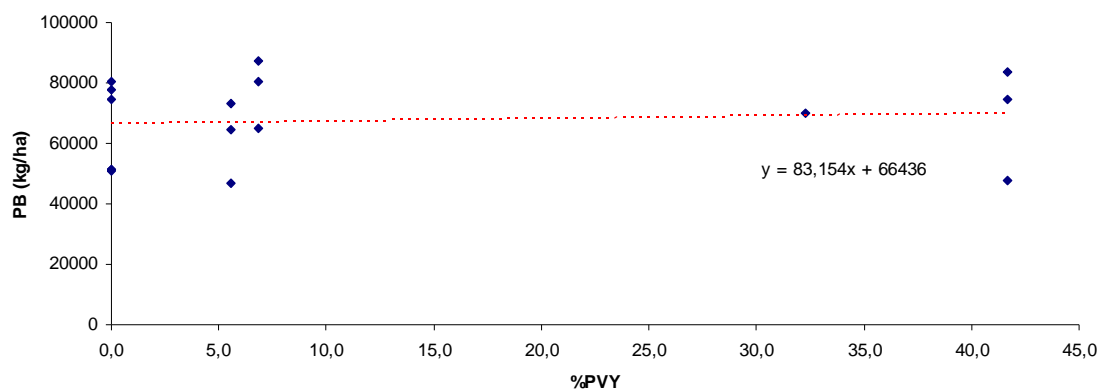


Figura 2.14 Porcentaje PVY frente a producción por ha en las parcelas de en sayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

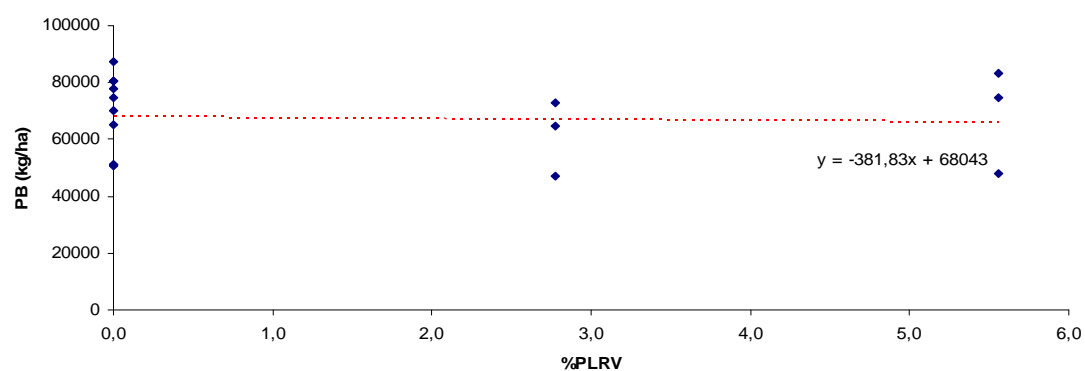


Figura 2.15 Porcentaje PLRV frente a producción por ha en las parcelas de ensayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

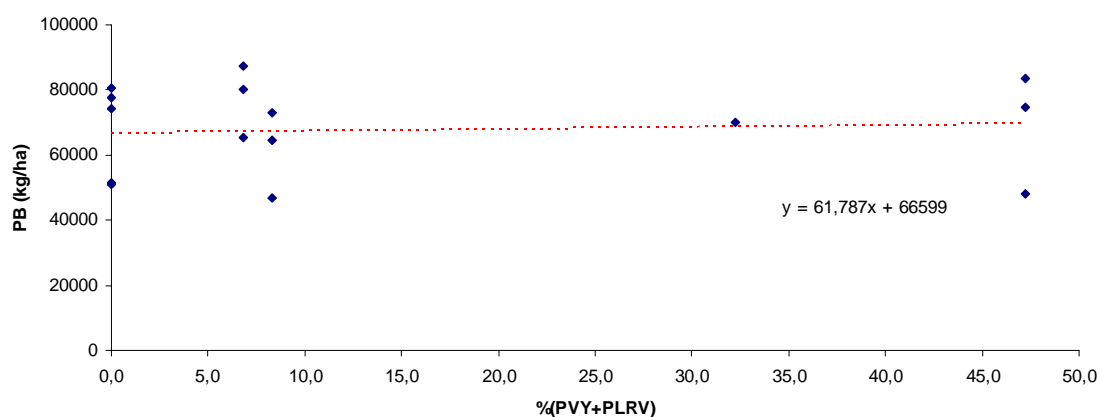


Figura 2.16 Porcentaje PVY+PLRV frente a producción por ha en las parcelas de en sayo de la variedad Kennebec en 2011 y recta/ecuación de regresión lineal (- - -).

Tabla 2.3 Resultado del análisis de correlación entre nivel de virosis de los lotes analizados y producción comercial obtenida en las parcelas de ensayo. Nivel de significación del coeficiente de Spearman (ρ)

año	variedad	Virus	ρ	gl	P	
2008	Agria	PVY	-0,495	54	0,0004	***
2008	Agria	PLRV	-0,510	54	0,0002	***
2008	Agria	suma	-0,485	54	0,0004	***
2008	Kennebec	PVY	-0,427	49	0,003	**
2008	Kennebec	PLRV	-0,481	49	0,0026	**
2008	Kennebec	suma	-0,519	49	0,0002	***
2011	Agria	PVY	-0,301	61	0,030	*
2011	Agria	PLRV	-0,195	61	0,200	ns
2011	Agria	suma	-0,353	61	0,006	**
2011	Kennebec	PVY	0,183	14	0,400	ns
2011	Kennebec	PLRV	-0,129	14	0,950	ns
2011	Kennebec	suma	0,000	14	0,888	ns

gl: grados de libertad; P: probabilidad

ns: no significativo; *, **, *** significativo con $p < 0,05$; 0,01 y 0,001 respectivamente

Ensayos en 2009 y 2010: Fina de Carballo

En la figura 2.17 se puede ver cómo el nivel de infección por PVY no tiene una relación directa con la producción de las plantas, incluso con los niveles utilizados de hasta el 100% de plantas infectadas en las parcelas de ensayo. Además, la variabilidad fue muy grande por lo que las pocas diferencias observadas no son significativas ($p = 0,580$). La nula influencia del PVY en la producción se confirma en el ensayo de 2010, con pesos de cosecha prácticamente iguales entre grupos con y sin PVY; aunque sí se observó que hay una cierta sensibilidad a PLRV (Fig. 2.18) pero que no es estadísticamente significativa ($p = 0,870$).

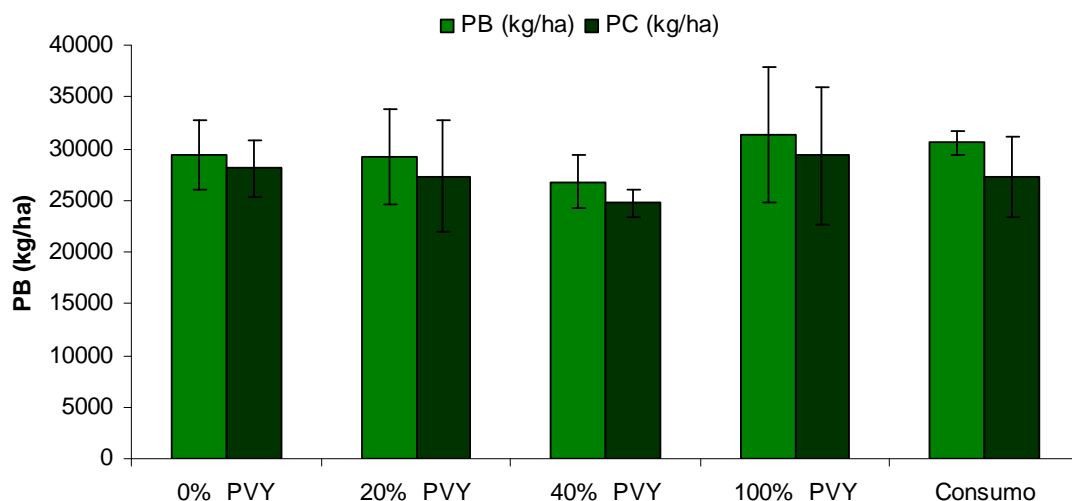


Figura 2.17 Producción bruta y comercial ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en parcelas sembradas con lotes de Fina de Carballo con niveles ascendentes de PVY en 2009.

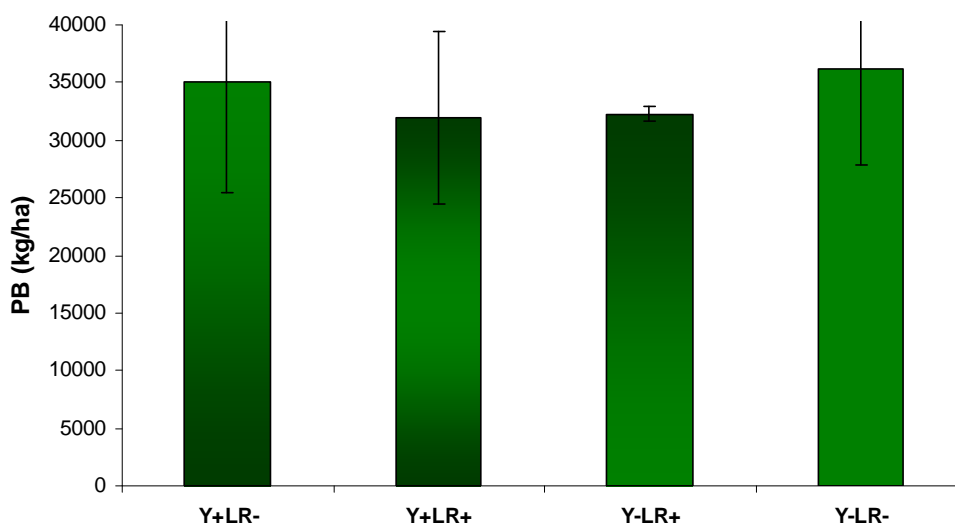


Figura 2.18 Producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) (media \pm dt) en parcelas sembradas con lotes de Fina de Carballo con 100% de PVY y/o PLRV en los ensayos de 2010.

DISCUSIÓN

Las comparaciones entre lotes de tan diversa procedencia y diferente estado sanitario general son complicadas y tienen que ser analizadas con precaución, siendo conscientes de que sólo dan una indicación general; pero los lotes “reales” de reemplazo son todo menos uniformes y las virosis son sólo uno de los factores a tener en cuenta de

ahí que los resultados que obtienen los agricultores sean a veces tan buenos o mejores que los que consiguen con patata certificada que también es, sobre todo últimamente, de calidad muy irregular. De ahí que sea tan importante que la recomendación de siembra, en el caso de reemplazo, sea hecha por técnicos extensionistas capaces de evaluar, no sólo los parámetros objetivos que indican las analíticas, como se hace en la valoración de patata de siembra certificada, sino también otros de muy diversa índole: fincas en las que se van a sembrar, rotación, manejo de la finca; y, en muchos casos, sobre todo, el “agricultor” y su forma de llevar su explotación; todo ello hace que sea posible recomendar siembra condicionada con diferentes niveles de virosis, algo que ya apuntaba Reestman en 1970. Que el PVY produce pérdidas de producción está suficientemente documentado por muchos autores desde hace décadas, con ensayos completamente controlados en los que se han hecho inoculaciones artificiales y se han multiplicado los tubérculos de las plantas así infectadas para asegurar la homogeneidad de los lotes a comparar (Hane y Hamm, 1999; Rykbost *et al.*, 1999; Nolte *et al.*, 2004; Whitworth, *et al.*, 2006). Pero está claro que hay otros muchos factores que escapan al control experimental y en los dos años de estudio los efectos del nivel de virosis fueron muy diferentes. Las producciones en 2011 fueron muy altas (excesivas, sobre todo para Kennebec) por las óptimas condiciones ambientales durante el cultivo y, aunque se ven tendencias, sobre todo en Agria con un mayor número de lotes, este hecho enmascaró las posibles diferencias entre lotes causadas por los virus. En 2008, sin embargo, las tendencias fueron más claras y hacia la disminución de producción a medida que se incrementaron los niveles de virosis; pero siempre con un nivel de tolerancia muy alto hasta que se sobrepasan el 15-20% en el caso de PVY y el 5-10% en el caso de PLRV. Ese nivel a partir del cual los daños son claros, es clave y, en la evaluación de patata de siembra, podría ser diferente para distintas variedades en función de su nivel de tolerancia, algo que ya fue discutido en una revisión hecha por Reestman (1970) se afirmaba que *“es teóricamente posible que, hasta un cierto porcentaje, las enfermedades no tengan un efecto directo en el rendimiento; incluso es posible que las plantas enfermas empiecen a tuberizar antes que las sanas y acaben teniendo rendimientos ligeramente mejores en ciertas condiciones”*. En algunos casos, el dato de producción bruta puede ser engañoso y es el dato de producción comercial el que muestra los peores resultados de los lotes de reemplazo frente a la patata certificada. Recientemente en Chile (Andrade *et al.*, 2008) se evaluaron parcelas demostrativas y se observó que el rendimiento total fue similar entre la parcela testigo y la del agricultor;

sin embargo, al seleccionar los tubérculos en base a calibre, forma y sanidad, el rendimiento comercial fue un hasta un 40% inferior en el reemplazo.

La variedad Fina de Carballo, por su parte, no pareció afectada por el PVY, sea cual sea su nivel (incluso el 100%) y, sin embargo, hay algunas pérdidas de producción cuando se presentó PLRV. Hay que tener en cuenta que estas parcelas de ensayo son de regadío y que las condiciones son óptimas para el desarrollo de las plantas. En condiciones normales, en su zona de cultivo y en secano, la producción de la Fina de Carballo suele estar entre los 15 y los 20000 kg·ha⁻¹ aunque en algunas parcelas establecidas con material certificado procedente de NEIKER también se han superado en ensayos los 25000 kg·ha⁻¹ (Alberto Martínez Pose, GDR Bergantiños, comunicación personal). Como la venta es directa en muchos casos y el agricultor consigue precios en torno a 1€·kg⁻¹ esas producciones se consideran rentables (Ia2P, 2010). En todo caso, la variabilidad en las producciones es tan grande y dependiente de las condiciones del año que descensos de producción en torno a un 10%, no serían suficientemente importantes como para que, en las condiciones de secano en las que habitualmente se planta la Fina de Carballo, el agricultor perciba los daños por virus. Por tanto, se puede afirmar que el reemplazo es bastante seguro y más si se controlan los pulgones y circunstancias en las que puede transmitirse PLRV y, sobre todo, si se eliminan las plantas con síntomas lo antes posible en campo y se hace selección de tubérculos, descartando para siembra los que presentan ciertas características, como deformaciones y, sobre todo, el aspecto del brote, que sale como en rosetas en los tubérculos con PLRV. Indudablemente se debe hacer selección para evitar todos los patógenos del suelo o al menos los que son susceptibles de ser detectados en el tubérculo mediante una adecuada observación. Pero en el medio/largo plazo, una regeneración periódica de estas variedades minoritarias es imprescindible para evitar que una acumulación excesiva de patógenos sistémicos acabe por reducir tanto las producciones que haga inviable económicamente su cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, F. 2002. El cultivo de la patata. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 495 pp.
- Andrade, N., Contreras, A. y Castro, I. 2008. Evaluación comparativa del efecto en el rendimiento y sanidad en el cultivo de la papa al utilizar semilla certificada y sin certificar. Agro Sur 36(2): 111-114.

- Cabaleiro, C., García-Calvo, L., Alvarez-Pousa, S. 2000. Virosis en el cultivo de la patata en Xinzo de Limia. Patata 2000, Congreso Iberoamericano sobre Investigación y Desarrollo en patata. Vitoria-Gasteiz, 2-6 Julio 2000.
- Cervera, M.T. y García, J.A. 1996. Patogénesis de virus de plantas. En: G. Llacer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello (eds), SEF-Phytoma España.
- García-Calvo, L. 2002. Estudio de cultivares comerciales de patatas (*Solanum tuberosum* L.). Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Escola Politécnica Superior. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela.
- Hane, D.C. y Hamm, P.B. 1999. Effects of seedborne potato virus Y infection in two potato cultivars expressing mild disease symptoms. Plant Disease 83:43-45.
- Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology, 4th ed. Academic Press, S. Diego (CA, USA) 1001 pp.
- Ia2p. 2010. Situación de la variedad Fina de Carballo. Proyecto de cooperación interterritorial “Nuevos Horizontes”. Asociación para o desenvolvemento rural da comarca de Ordes. Entrada en Nov. 2010, consultado el 11/03/2012. URL: http://costanoroeste.org/Administracion/documentacion/CULTIVO_FINA_CARB_ALLO.pdf
- Johnson, D.A. (Ed). 2007. Potato Health Management, 2nd edition. APS Press, St. Paul, Minnesota (USA).
- McDonald, J.H. 2009. Handbook of Biological Statistics, 2nd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland (USA).
- Nolte, P., Whitworth, J.L., Thornton, M.K. y McIntosh, C.S. 2004. Effect of seedborne Potato virus Y on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato. Plant Disease 88:248-252.
- Reestman, A.J. 1970. Importance of the degree of virus infection for the production of ware potatoes. Potato Research 13(4): 248–268.
- Rykbost, K.A., Hane, D.C., Hamm, P.B., Voss, R., y Kirby, D. 1999. Effects of seedborne Potato virus Y on Russet Norkotah performance. American Journal of Potato Research. 76:91-96.
- Singh, R.P., Valkonen J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C., y Schubert, J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Archives of Virology 153: 1–13.

- Wessa, P. 2012. Spearman Rank Correlation (v1.0.1) in Free Statistics Software (v1.1.23-r7), Office for Research Development and Education; consultado el 23/04/12, URL http://www.wessa.net/rwasp_spearman.wasp/
- Whitworth, J. L., Nolte, P., McIntosh, C., y Davidson, R. 2006. Effect of Potato virus Y on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels. *Plant Disease* 90:73-76.
- Zaag, van der, D.E. 1987. Yield reduction relation to virus infection. En: J.A. De Bokx y J.P.H. Van der Want (Eds). *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Pudoc, Wageningen, 2nd ed. pp: 146-150.

CAPITULO 3

CAPITULO 3: Optimización de la Inmunoimpresión directa ELISA (DIP-ELISA) para la detección de PVY y PLRV en patata de re-empleo. Kits de detección.

RESUMEN

La inmunoimpresión directa ELISA es el método más sencillo y económico de detección de virus vegetales y es el método que mejor se adapta a una utilización por parte de técnicos y agricultores, al no necesitar infraestructura ni condiciones especiales para su utilización. Se estudia la viabilidad de su uso para la detección de virus de la patata (PVY y PLRV) en tubérculos brotados y se compara la sensibilidad y fiabilidad, los tiempos y los costes con los que se producen utilizando el método oficial de análisis DAS-ELISA. La concentración tanto de PVY como de PLRV en las plantas y tubérculos, no es homogénea y varía con el tiempo y por tanto la muestra y la fecha afectan al resultado de las analíticas. Con la sensibilidad actual de los métodos serológicos se podría estar subestimando el nivel de virosis en la patata certificada, sobre todo cuando los análisis se hacen recién rota la dormancia de forma artificial. El protocolo de DIP-ELISA propuesto, mejora los costes y tiempos propuestos por otros autores, tiene suficiente sensibilidad para la detección de PVY y PLRV, con un coste 5-6 veces inferior y permite obtener los resultados en menos tiempo (3,2 h vs. 14 h) que el DAS-ELISA.

El diseño de kits completos y su comercialización pueden ser una valiosa herramienta para los agricultores que quieren hacer reemplazo de su propia patata para siembra.

Palabras clave: patata, virus, diagnóstico, DIP, ELISA, PVY, PLRV

INTRODUCCIÓN

Desde que en 1977 Clark y Adams pusieran a punto un método de detección de virus vegetales basado en reacciones inmunoenzimáticas, el ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*), se fueron desarrollando un buen número de variantes de la técnica (Hawkes *et al.*, 1982; Koenig y Paul, 1982). En 1985, Banttari y Goodwin, y algo más tarde Powell (1987) describieron un procedimiento de impresión de cortes de tejidos en membranas de nitrocelulosa y su posterior revelado inmunológico, que ofrece la posibilidad de detectar los antígenos localizados en la impresión del tejido vegetal y evita la realización de extractos. La Inmuno-impresión directa (*Direct Immunoprinting*-DIP) conocida también como *Tissue Printing* (TP), *Tissue Blot Immunoassay* (TBIA), *Direct Tissue Blot Assay* (DTBA), *Nitrocellulose Membrane* (NCM-ELISA) y otras denominaciones, ha sido puesta a punto y utilizada desde entonces para la detección de varios virus, bacterias y fitoplasmas en diferentes cultivos y tipos de material vegetal como una variante más de ELISA para ser utilizada como alternativa al Double

Antibody Sandwich (DAS) (Powell, 1987; Lin *et al.*, 1990; Hsu y Lawson, 1991; Makkouk *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 1994; Gabler *et al.*, 2004.). Precisamente en patata (Clark y Adams, 1977; Banttari y Goodwin, 1985) es donde primero se utilizaron las técnicas ELISA (Gugerli y Gehriger, 1980) y los principales virus de la patata, que deben estar por debajo de ciertos límites en patata de siembra certificada, se pueden detectar bien por DIP (Lizarraga, 1989; Bravo-Almonacid *et al.*, 1992; Samson *et al.*, 1993; Whitworth *et al.*, 1993; Chao *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2002). Sin embargo DAS-ELISA sigue siendo la técnica oficial más utilizada en todo el mundo para la certificación de tubérculo para siembra (Slack y Singh, 1998) porque los laboratorios encargados de realizar análisis rutinarios de la patata de siembra están ya bien equipados para seguir los protocolos DAS-ELISA estándar, que tienen la ventaja de tener un sistema objetivo de medida de las reacciones positivas (colorimétrico) (Hampton *et al.*, 1990). Pero el DAS-ELISA requiere bastante tiempo y trabajo al necesitar una extracción previa de la muestra procedente del tubérculo y varios pasos con periodos de incubación largos. Si bien el proceso se puede automatizar en cierta medida, no todos los laboratorios están dotados con ese tipo de instalaciones y el coste de esas analíticas puede no ser asequible en según qué circunstancias y zonas de producción. En un análisis particular, en el que lo que el asesor del agricultor o el propio agricultor busca es una orientación de la calidad de su patata para reemplazo en cuanto a la presencia de virosis graves, no compensa económicamente hacer DAS-ELISA y la inmunoimpresión directa puede ser una técnica muy adecuada, ya utilizada por agricultores y viveristas de otros sectores, sobre todo de huerta para virus como el TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) (Hsu y Lawson, 1991) y también en frutales, sobre todo en cítricos para la detección de *Citrus tristeza virus* (CTV) y *Plum pox virus* (PPV) en viveros (Cambra *et al.*, 1991, 2000 a y b; Garsey *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000). También se ha usado con éxito en estudios epidemiológicos de *Grapevine leafroll associated viruses* (GLRaV) (Couceiro *et al.*, 2006) o en estudios de la distribución de closterovirus en plantas de piña tropical (Hu *et al.*, 1997), entre otros.

La mayor parte de los investigadores han encontrado una buena correlación entre los resultados del DAS y el DIP ELISA en el caso de virus de patata y una sensibilidad similar (Banttari y Goodwin, 1985; Bravo-Almonacid *et al.*, 1992; Whitworth *et al.*, 1993, 2000), aunque en algunos casos DIP-ELISA detectó más muestras positivas que DAS-ELISA (Guzman *et al.*, 2002). A pesar de que es un método ampliamente utilizado y de probada fiabilidad, DAS-ELISA presenta algunos inconvenientes: baja

sensibilidad en tubérculos recién o poco brotados, muchos pocillos y placas con un número excesivo de falsos positivos y reacciones inespecíficas, resultados irregulares en los positivos y resultados poco consistentes con anticuerpos de diferentes casas comerciales. Además, aunque DAS-ELISA es una técnica bastante sencilla, hay muchos pasos, varios tampones a utilizar, lavados que se repiten etc. que deben ser hechos a mano cuando no se dispone de equipamiento automático y por personal no especializado.

Uno de los objetivos de este trabajo es proporcionar a los técnicos y/o agricultores una herramienta sencilla y barata, pero que mantenga los estándares de fiabilidad, para utilizarla en el análisis del material de reemplazo. Para ello se propone optimizar los protocolos de impresión de tejidos para evitar errores y reducir costes y tiempo necesario por muestra y comparar DIP y DAS ELISA. Las modificaciones de los protocolos incluyen el uso de membranas de nitrocelulosa más baratas (filtros de agua), bloqueo de membranas con reactivos comunes o más rápidos, incubación en soluciones de anticuerpo más diluidas de lo que se utiliza en DAS ELISA, reutilización de soluciones de anticuerpo e incubación en una mezcla de varios anticuerpos para detectar más de un virus por análisis (PVY y PLRV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos: se utilizaron anticuerpos policlonales específicos para PVY y PLRV (ocasionalmente también contra PVX, PVA, PVM y PVS); en el caso de DIP ELISA sólo se utilizaron anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina; en DAS se emplearon ambos. La mayoría de los análisis se hicieron con anticuerpos de la casa Loewe y en el Instituto del Campo con Bioreba AG (Basilea, Suiza). Los anticuerpos se diluyeron en PBS (para 1 L: NaCl 8 g, KH₂PO₄ 0,2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2,9 g, KCl 0,2 g, pH 7,2-7,4) o en el tampón conjugado recomendado por Bioreba AG para los DAS-ELISA (para 1 L: Tris 2,4 g; NaCl, 8 g; PVP K25, 20 g; Tween 20, 0,5 g; BSA 2 g; MgCl₂·6H₂O, 0,2 g; KCl, 0,2 g; pH 7,2-7,4).

Material vegetal: pecíolos, tallos y brotes de tubérculo, tanto para DAS como para DIP ELISA; la mayoría de los tests se hicieron con brotes de 1-2 cm.

DIP-ELISA. En esencia, consiste en cortar el material vegetal a analizar y apretar suavemente el corte fresco sobre una superficie de nitrocelulosa del tamaño adecuado; la membrana se bloquea con proteínas durante un periodo corto de tiempo y posteriormente se incuba en una solución de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina diluidos en un tampón. Después de lavar cuidadosamente la membrana, varias veces, con tampón salino, se incuba en una solución substrato (BCIP-NBT) que reaccionará con la fosfatasa alcalina del anticuerpo dando lugar a una coloración azul/púrpura. En todas las membranas deben ir cortes de muestras positivas y negativas para el virus que se esté analizando. Dependiendo del virus, en las muestras positivas el color se desarrolla en la impresión completa (PVY) o sólo en la sección correspondiente al floema (PLRV). Es recomendable que dos personas observen la misma membrana independientemente en caso de dudas y para los virus del floema puede ser necesario observar la membrana bajo una lupa.

Los distintos protocolos descritos en la bibliografía son muy variados en lo que se refiere a tipos de membrana, soluciones de bloqueo, tampones, preparación o estado del substrato y proceso de revelado, tiempos y temperaturas de incubación y material vegetal utilizado (Banttari y Goodwin, 1985; Power, 1987; Lin *et al.*, 1990; Hsu y Lawson, 1991; Bravo-Almonacid *et al.*, 1992; Makkouk *et al.*, 1993; Whitworth *et al.*, 1993; Guzman *et al.*, 2002). En los trabajos previos de este estudio comparamos la mayoría de los procedimientos y dieron resultados similares por lo que la optimización del protocolo se hizo en función de costes de materiales, facilidad de manejo o reducción de tiempo. Por ejemplo, se compararon las membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro con las de 0,2 µm y los resultados fueron similares, pero las membranas de 0,2 µm se quiebran con más facilidad y son más difíciles de manejar y, además, en el caso de las de 0,45 µm existen en el mercado membranas estándar, ya cortadas y cuadrículadas, destinadas a otros usos (análisis de aguas) y con un precio mucho más competitivo.

El protocolo óptimo resultante es el siguiente: Las membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Sartorius ref. 11406-047 ACN) se bloquean en leche descremada al 1% en agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4-6 °C; otra alternativa más corta y con iguales resultados contempla la posibilidad de boquear en polyvinyl alcohol (al 1% en agua destilada) durante un minuto (aunque lleva un tiempo conseguir la disolución, al menos 5 minutos) (Makkouk *et al.*, 1993). Se recomienda agitar durante el bloqueo. Las membranas se pueden pasar directamente a la solución de

anticuerpo o aclararlas con un tampón salino (0.085% NaCl y 0.05% Tween 20[®] en agua destilada), sobre todo si se va a utilizar varias veces la solución de anticuerpo. El tiempo de incubación en la solución de anticuerpo específico puede ser de 1,5-2,5 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos pueden/deben diluirse hasta 2-2,5 veces más que para ELISA y la solución se puede usar simultáneamente para más de una membrana (máximo 2-3) y reutilizarse al menos 3 veces. Después de la incubación las membranas se lavan 3-4 veces en agitación suave en solución salina, durante 5 minutos. Por último, las membranas, de una en una, se cubren con una solución de sustrato (BCIP-NBT) listo para usar (SIGMA B-1911) y el color morado comienza a revelarse después de 5-10 minutos; la reacción se para con agua corriente una vez que los controles positivos están claros. Las membranas son observadas a simple vista y después bajo la lupa para confirmar positivos/negativos dudosos, sobre todo en el caso de PLRV.

Para la detección de PVY y PLRV simultáneamente, se pueden mezclar los anticuerpos y, aun en el caso de muestras positivas para ambos virus, se pueden diferenciar bien las marcas, porque PLRV aparece sólo en el floema y aunque PVY da coloración morada en toda la impresión, normalmente las punteaduras de PLRV siguen claras. Si no se precisa saber qué virus está presente sino simplemente identificar muestras virosadas o no, se pueden mezclar anticuerpos para varios virus diferentes (PLRV, PVY, PVX, PVA, PVM, y PVS) en la misma solución y todo el test se hace con una sola membrana e impresión. Esto puede ser útil en el caso de muestras que se espera estén prácticamente libres de virus y sólo las que aparecen con marca positiva serían re-analizadas en membranas separadas para cada virus.

DAS-ELISA. El análisis se hizo siguiendo los protocolos estándar basados en el descrito por Clark y Adams (1977), con los anticuerpos diluidos como indica la casa que los comercializa: 1:200 (Loewe Biochemica GMBH, Sauerlach, Alemania), 1:1000 (Bioreba AG, Basilea, Suiza) y siguiendo los tiempos de incubación recomendados por los fabricantes. Como tampón de extracción se utilizó PBS-Tween y como tampón conjugado el descrito antes. Las muestras se consideran positivas cuando el valor de absorbancia es 3 veces superior al de la media de muestras negativas y siempre sobre un valor de 0,100.

La coincidencia entre DIP y DAS-ELISA se contabilizó sólo cuando las lecturas coincidieron muestra a muestra y no por conteo de número de positivos y negativos totales.

Ensayos: con estos dos protocolos y siempre para PVY y PLRV, se analizaron 148 muestras en 2001 en dos fechas después de la ruptura de la dormancia y brotación de los tubérculos. Tras observar cierto desacuerdo en los resultados procedentes de patatas de la misma planta, se analizaron por DIP todos los tubérculos procedentes de 21 plantas. En 2003, para validar el método en el laboratorio del Instituto do Campo (INORDE) se hicieron las impresiones de 1996 brotes de tubérculo que posteriormente se analizaron por DAS-ELISA. Las membranas fueron enviadas al laboratorio de Protección vegetal de la Escola Politécnica Superior de la USC y se analizaron por DIP con los mencionados anticuerpos de Loewe Biochemica. En 2002, 2003 y 2004 se hicieron algunas placas y membranas más utilizando para DIP el mismo anticuerpo conjugado utilizado en las placas del DAS-ELISA.

En DIP-ELISA el lugar del corte en el brote del tubérculo puede ser una fuente de variación porque es la única porción de tejido analizado, al contrario de DAS-ELISA en la que se tritura un brote completo. Para ver si el punto de corte es realmente significativo, se analizaron 90 tubérculos por DIP-ELISA haciendo 4 cortes desde la punta a la base de brotes de 3-4 cm. Tras la impresión de los cuatro cortes las piezas de brote se trituraron en tampón de extracción en bolsas de plástico para analizar por DAS-ELISA.

Costes: el coste de los materiales y tiempo consumido en los dos tipos de test con los protocolos y reactivos utilizados se evaluaron siguiendo la metodología propuesta por Samson *et al.* (1993). Los tiempos y materiales necesarios se estimaron para una membrana con 45 muestras duplicadas (90 posiciones o pocillos, según el test), tres marcas positivas y tres negativas, de forma que den el total de 96 marcas, equivalentes a los pocillos de una placa ELISA. En el artículo de Samson *et al.* (1993) los cálculos se hicieron en base a 72 muestras que se marcaron en membranas de 5 x 6 cm² que tenían un precio de 2,28\$ en 1992 y el anticuerpo conjugado (no mencionan el volumen empleado para esa membrana) tenía un coste de 5,7\$. Los precios actuales (2012) fueron presupuestados por las casas comerciales que venden los reactivos a laboratorios de investigación a pequeña escala. Los reactivos que mayor incidencia tienen en el coste

final son las membranas (121 € caja de 100 de 4,5 cm y 880 € caja de 20 de 9 cm), las placas de poliestireno (1-3 € por unidad dependiendo de la casa comercial y calidad), los anticuerpos (357 € el kit de anticuerpo y conjugado para 500 pocillos llenos con 200 μ L) y el sustrato de revelado, que suelen ser pastillas de 10-20 μ g en DAS-ELISA (2,5-5 €/pastilla) o el mencionado sustrato líquido listo para utilizar en DIP-ELISA (82 € 100 mL).

En 2012 se diseñó un kit, el “PATAKIT” para distribución a los agricultores; inicialmente el revelado se planteó que se haga en la empresa Agro Xinzo SL que tiene un proyecto de investigación (FEADER 2010) con el CTC y la USC relacionado con esta temática pero el objetivo final es que se comercialicen los kits completos para su realización de principio a final por los agricultores. Dado que el número de tubérculos por lote es muy variable entre los agricultores que analizan su propia patata para siembra, los kits se hicieron con dos tipos de membranas (siempre de nitrocelulosa de 0,45 μ m): las ya mencionadas de 4,5 cm de diámetro y otras de 9 cm de diámetro, para lotes grandes con el fin de facilitar la impresión de brotes a gente no habituada a trabajos meticulosos. Con los precios anteriores para reactivos y los de las membranas grandes que cuestan en torno a 4,4 € cada una, modificando las cantidades mínimas necesarias de reactivos e incluyendo bolsas, etiquetas, impresión en color de tablas e instrucciones, se calculó el coste mínimo de materiales y reactivos del kit, sin incluir la mano de obra.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del DIP-ELISA se obtienen rápidamente, suelen ser claros y permiten distinguir el tipo de virus que se está analizando incluso en infecciones mixtas (Fig. 3.1).

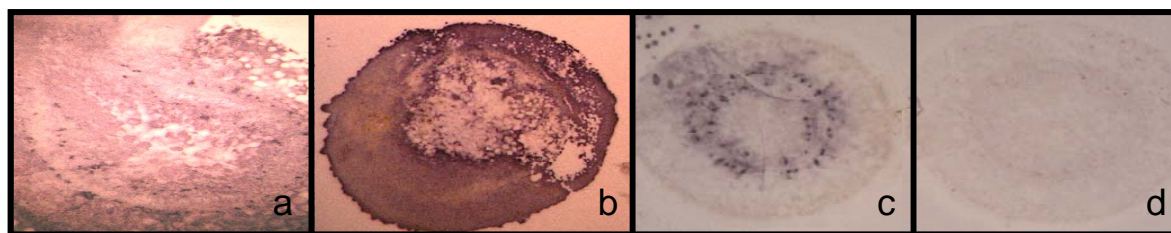


Figura 3.1 Revelado de impresiones de muestra (a) positiva para PVY y PLRV, (b) positiva para PVY, (c) positiva para PLRV y (d) negativa para ambos.

Un 57% de las plantas de las que se analizaron todos los tubérculos después de brotar, no dieron el mismo resultado lo que indica una distribución irregular en la planta que se mantiene en los tubérculos (Figura 3.2)

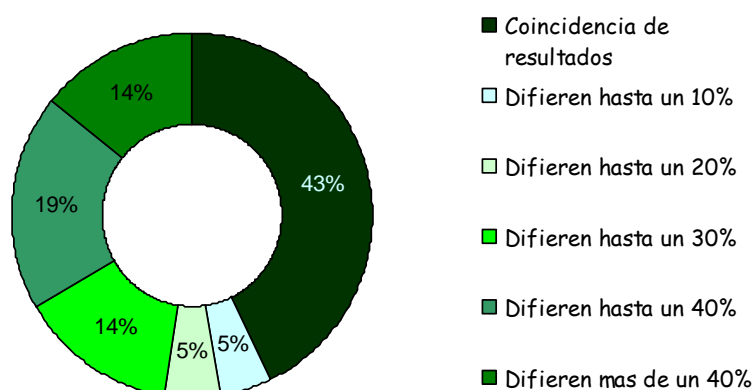


Figura 3.2 Variación en resultados de análisis de PVY y PLRV en los tubérculos de una misma planta; gráfico en base a los análisis de todos los tubérculos de 21 plantas.

La Tabla 3.1 muestra los resultados de los análisis DIP-ELISA de los cuatro cortes de los brotes procedentes de 90 patatas, comparados con los del DAS-ELISA de los cuatro pedazos juntos. Sólo 2 muestras de PVY positivas por DAS fueron negativas por DIP para las 4 impresiones y una sola muestra fue positiva para las cuatro impresiones en DIP y negativa por DAS. En el caso de PLRV solo una muestra fue positiva por DAS y los 4 cortes negativos por DIP. PVY se detectó igual en todos los cortes pero la detección de PLRV fue peor en los cortes del ápice (34 positivos) que en los cortes basales (43 positivos).

Tabla 3.1 Número de muestras positivas (de 90 tubérculos) analizadas por DIP-ELISA en cuatro puntos a lo largo del brote del tubérculo y por DAS-ELISA juntando todos los fragmentos.

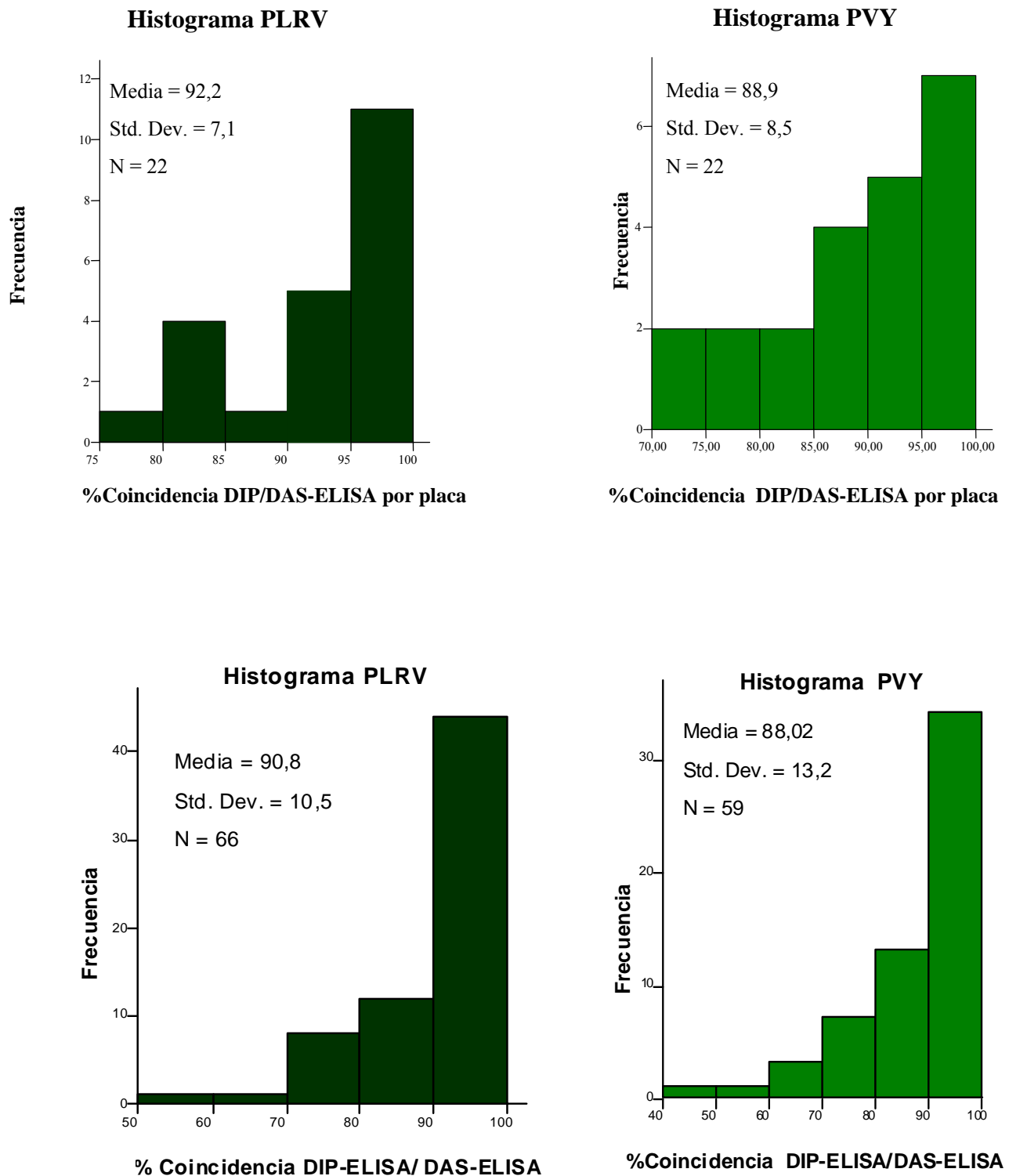
ELISA	DIP				DAS
corte	1º	2º	3º	4º	todos
PVY	65	66	65	65	67
PLRV	34	44	45	43	46

1º corte: ápice; 4º corte: base

La coincidencia de resultados entre los dos métodos de análisis en los test hechos en 2001 fue del 85,8% para PVY y del 92,5 % para PLRV (Figs. 3.3 a 3.6). Bravo-Almonacid *et al.* (1992) consiguieron los mejores resultados para PVY (97,2-100% coincidencia) con tejido escachado (“squashed”) y un protocolo más complejo para DIP-ELISA. En nuestros ensayos, DAS dio más positivos que DIP pero hubo un buen número de muestras que dieron lecturas de absorbancia cerca del límite y que podrían ser falsos positivos. En DIP, sin embargo, los positivos fueron siempre bien definidos para ambos virus (Fig. 3.1). Cuando los tubérculos se analizaron justo cuando empezaban a brotar, tanto DAS como DIP-ELISA dieron menos porcentaje de resultados positivos que dos meses después, con brotes más largos. Las diferencias fueron especialmente importantes para PLRV: 8 plantas de 148 dieron positivo en enero y 37 en marzo; para PVY, 16 muestras fueron positivas en el primer test y 36 en el segundo. Si esto es así, los análisis DAS-ELISA oficiales que se realizan para la certificación del material de siembra, que se hacen tras forzar la brotación y utilizando extractores especiales de jugo siempre antes de que haya un brote bien marcado, podrían estar subestimando el nivel de virosis de los lotes. En este sentido, las técnicas moleculares, de alta sensibilidad, probablemente permitirían evitar esos errores (Mallik *et al.*, 2012); pero si la sensibilidad mejora lo suficiente y parece que en algunos países como Canadá se considera que ya ha llegado ese punto, el objetivo último sería conseguir poder detectar los virus en las plantaciones justo antes de la destrucción de matas en vez de tener que esperar a evaluar los tubérculos una vez rota la dormancia.

El porcentaje de coincidencia para las 1996 muestras analizadas en 2003 fue del 89% para PVY y de 92,2% para PLRV (muestra a muestra). La mayoría de artículos muestran sus resultados como número de positivos encontrados por cada método pero sin especificar si hay una coincidencia muestra a muestra. Expresado de ese modo, para el total de positivos, la coincidencia es mayor (93% para PVY y 94.6% para PLRV). Está claro que una parte de la no correspondencia de los análisis de este año puede ser atribuida al hecho de que los anticuerpos no fueran de la misma casa comercial ni lote e incluso a que las impresiones no fueron hechas por las mismas personas. De nuevo DAS dio más resultados positivos y de nuevo buena parte de las placas tenían resultados positivos muy cerca del umbral por lo que podrían ser falsos positivos. Estos porcentajes de coincidencia son similares a los publicados por Samson *et al.* (1993): también ellos encontraron más positivos por DAS para PLRV y PVY pero en cambio otros virus (PVS y PVA) se detectaron mejor por DIP. Y Guzman *et al.* (2002),

detectaron muchos más positivos para PLRV y PVY utilizando DIP en vez de DAS-ELISA.



Figuras 3.3 a 3.6 Histogramas de porcentaje de coincidencia de métodos de análisis DIP/DAS-ELISA referidos a placas (3.3 y 3.4) o a lotes analizados (3.5 y 3.6), para PVY y PLRV.

En la última tanda de ensayos, cuando los análisis se hicieron en el mismo laboratorio y utilizando exactamente la misma solución de anticuerpo conjugado, la coincidencia fue mayor, obteniendo para 207 muestras, coincidencias del 95,2% para PVY y del 98,1% para PLRV.

En el laboratorio de la Escola Politécnica Superior del Campus de Lugo de la USC los resultados de DIP-ELISA fueron casi siempre más claros que por DAS y, sobre todo, más fáciles de interpretar a pesar de no disponer de la posibilidad de una “lectura objetiva” de color. Ocurre con demasiada frecuencia que muestras de tubérculos sanos dan lectura de absorbancias altas que dificultan la interpretación; en algunos casos, una mayor dilución del anticuerpo de PVY puede hacer más claras las lecturas del DAS-ELISA. En inmunoimpresión los problemas más comunes fueron debidos a mal manejo de las membranas antes, durante o después de la impresión (huellas de dedos, suciedad de los tubérculos, restos de alcohol en el escalpelo o sobre las membranas). Por ello y después de analizadas muchas muestras se pueden hacer una serie de recomendaciones que serían de utilidad, sobre todo, en caso de que la técnica se proponga en un futuro para su realización por parte de los agricultores que analizan su patata de reemplazo para decidir si se utiliza o no:

- Analizar los tubérculos cuanto más brotados posible: después de tomar la muestra poner en oscuridad y temperatura suave para acelerar la brotación
- Cortar cerca de la base
- Manipular las membranas con guantes o con pinzas
- Uso de cuchillas bien afiladas (mejor desechables)
- Hacer los cortes tan perpendiculares al brote como sea posible
- Hacer más de una marca por muestra, mejor si son de varios cortes y de varios brotes.
- Desinfectar la cuchilla con alcohol y limpiar o dejar secar bien antes del próximo corte
- Hacer las impresiones con una presión firme y uniforme pero no demasiado fuerte para no dañar la membrana porque en ese caso quedarían restos de enzima en las zonas dañadas y no se lavarían bien, dando lugar a falsos positivos.

En cuanto a la comparación de costes de las dos técnicas, el DAS-ELISA fue una media de 5-6 veces mayor que el de DIP para el análisis estándar de una sola membrana

(Tabla 3.2). Pero ese sería el coste de DIP sin utilizar las medidas de ahorro propuestas; si el anticuerpo conjugado se diluye dos veces más de lo que se recomienda para ELISA, algo que además es recomendable, y la solución se utiliza para un mínimo de 3 membranas (podrían ser bastantes más, Bravo-Almohacid *et al.*, 1992, llegan a 5 veces), el coste para un número de muestras igual al que se hace en una placa ELISA, podría ser de unos 5,2 €, y bajaría hasta 2,6 € por 45 muestras si en cada tanda se meten 2 membranas por placa (Tabla 3.3). En el DAS ELISA la dilución no es recomendable, al menos para PLRV, y aunque también es posible la reutilización de anticuerpo, las pérdidas de reactivo en los trasvases y el tiempo necesario para extraer los anticuerpos puede ser elevado. Además debido a la duración del análisis y la incubación a temperaturas de 35-37 °C en cámara, hay mayor riesgo de que se degraden los reactivos.

Dado el tiempo transcurrido (casi 20 años), es complejo comparar los costes con los que presentaron Samson *et al.* en 1993, aunque los precios de los reactivos y, sobre todo, de las membranas, no parecen haberse encarecido demasiado; sobre todo en el caso de las membranas, el tipo de membrana/filtro de aguas utilizado, que es un producto de gran consumo, fue responsable de la disminución de precio. Haciendo una estimación en base al precio de las membranas y de los anticuerpos en 1993 y 2012, los 8,78 \$ de coste total/membrana con 72 muestras que figuraban en el artículo de Samson podrían ser hoy unos 12 €, es decir, casi lo mismo que la membrana estándar con la misma concentración de anticuerpo que en DAS-ELISA. Ese coste es el que se compararía con los 7,7-11,3 € estimados para una membrana estándar. Algunos autores, para reducir costes, han recurrido a otros soportes, incluso papel, con resultados aparentemente buenos (Makkouk y Kumari, 2002.). En el presente trabajo, los positivos no fueron suficientemente claros cuando se hicieron pruebas con papeles similares.

En cuanto a tiempos, el mínimo para llevar a cabo DIP puede ser de unas 3,2 horas, incluyendo el tiempo de impresión de las 48 muestras duplicadas y los tiempos de incubación. En el caso de DAS-ELISA el mínimo sería en torno a 14 horas (4,4 veces más) aunque algunos tiempos de incubación del DAS podrían reducirse sin mucho problema pero al superar las 8 horas, siempre obliga a hacer el test en dos jornadas laborales (Tabla 3.4). En el artículo de Samson *et al.* (1993), la inmunimpresión lleva unas 6 horas: el bloqueo con polivinil alcohol y el uso de substrato líquido listo para usar redujo considerablemente el tiempo.

Tabla 3.2 Coste de los materiales y reactivos para analizar 45 muestras + controles (positivo y negativo) por duplicado con DIP o DAS-ELISA (1 virus).

DIP-ELISA		DAS-ELISA	
Membrana de 4,5 cm Ø 0.45 µm	1.25 €	Bolsas plásticas para triturado x 47	3 €
Polyvinyl alcohol 1% (o leche des)	0,01 €	Placa y puntas de pipeta	1,5-3,5 €
Placa Petri 50 mm Ø	0,3 €	Anticuerpo (10-20 mL ³)	14,3-28,6 €
Tampones ¹	0,1 €	Tampones ²	0,6-1 €
Anticuerpo conjugado ⁴ (10-20µL/5 mL)	3,6-7,2€	Anticuerpo conjugado(10-20 mL ³)	14,3-28,6 €
Substrato (3 mL)	2,5 €	Substrato (10-20 µg tablets ³)	2,5-5 €
Total	7,7-11,3 €	Total	36,2– 69,7 €

¹ Lavado y conjugado ; ² Tapizado, lavado, conjugado y substrato; ³ según sean 100 o 200 µL por pocillo; ⁴ Loewe: sobre precio de ½ lote;

Tabla 3.3 Coste de los materiales y reactivos cuando se procesan 3 membranas (45x3=135 muestras por duplicado) con el mismo anticuerpo conjugado por DIP-ELISA en comparación con el procedimiento estándar sin reutilizar anticuerpo analizando las 135 muestras por DAS-ELISA.

DIP-ELISA		DAS-ELISA	
Membrana de 4,5 cm Ø 0.45 µm	3x1,25 €	Bolsas plásticas para triturado x 47	3x3 €
Polyvinyl alcohol 1% (o leche des)	3x0,01 €	Placa y puntas de pipeta	3x1,5-3,5 €
Placa Petri 50 mm Ø	0,3 €	Anticuerpo (10-20 mL ³)	3x(14,3-28,6) €
Tampones ¹	3x0,1 €	Tampones ²	3x0,6-1 €
Anticuerpo conjugado ⁴ (10-20µL/5 mL)	3,6-7,2 €	Anticuerpo conjugado ⁴ (10-20 mL ³)	3x(14,3-28,6) €
Substrato (3 mL)	3x2,5€	Substrato (10-20 µg tabletas ³)	3x2,5-5 €
Total	15,5-19,1 €	Total	85,8–209,1 €
Por membrana	5,2-6,4	Por placa	36,2-69,7

¹ Lavado y conjugado ; ² Tapizado, lavado, conjugado y substrato; ³ según sean 100 o 200 µL; ⁴ Loewe, dos diluciones en DIP

Tabla 3.4 Tiempos mínimos necesarios para el análisis de 45 muestras+controles por duplicado con DIP o DAS-ELISA

DIP-ELISA			DAS-ELISA		
Paso	Tiempo	espera	Paso	Tiempo	espera
Organización de las muestras y confección del mapa de la membrana.	15'		Organización de las muestras y confección del mapa de la placa.	15'	
Impresión de la membrana	30'		Preparación, dispensado e incubación del anticuerpo.	10'	180'
			Triturado de las muestras.	60'	
Preparación y bloqueo de membranas con Poly (vinyl alcohol) o leche descremada	5'	1'	Dispensado e Incubación.	30'	180'
Preparación e incubación del anticuerpo.	5'	90'	Preparación, dispensado e incubación del anticuerpo conjugado.	10'	180'
Lavado de membranas	5'	15'	Lavados de la placa después de cada incubación (3 x 3 x 5')	15'	45'
Adición del sustrato	1'	10'	Preparación, dispensado e incubación del sustrato.	10'	30'
Lectura de la membrana y procesamiento de datos	15'		Lectura de la placa y procesamiento de datos.	15'	90'
Tiempo total en horas	1.5+1,7=3,2		Tiempo total en horas	2,75+11,9=14,7	

* Tiempos de espera.

El coste mínimo de materiales y reactivos de los dos tipos de PATAKIT se muestra en la tabla 3.5. En 2011 se hizo el primer reparto para validar la utilidad de los kits y, sobre todo, determinar el coste real medio por muestra ya que los datos obtenidos en el laboratorio suponen que una membrana pequeña pueden soportar 96 impresiones de brotes de tuberculosis y una grande hasta 240 (Fig. 3.7e). Eso es así cuando se hace con un cierto orden y brotes de tamaño uniforme (Fig. 3.7c y d) pero puede variar mucho por habilidad, orden y tipo de brotes según estado y variedad (Fig. 3.7a,b,f). Además, la mayoría de agricultores tienen varios lotes, procedentes de fincas distintas, que deben ir en membranas diferentes para evitar confusiones y ello puede implicar que muchas membranas no se cubran por completo. Cabe esperar que como el precio final tendrá que ser fijo, los agricultores aumentarán su pericia con el tiempo para reducir el número de kits que tienen que adquirir.

Tabla 3.5 Coste de los materiales y reactivos de dos modelos de PATAKIT, con 3 membranas de 4,5 cm (para 135 muestras) o 3 membranas de 9 cm (para 450 muestras).

PATAKIT 3 x 4,5 cm Ø		PATAKIT 3 x 9 cm Ø	
Membranas de 4,5 cm Ø 0.45 µm	3x1,25 €	Membranas de 9 cm Ø 0.45 µm	3x4,4 €
Polyvinyl alcohol 1% (o leche des)	3x0,01 €	Polyvinyl alcohol 1% (o leche des)	3x0,03 €
Placa Petri 50 mm Ø	0,3 €	Placa Petri 91 mm Ø	-
Tampones ¹	3x 0,1 €	Tampones ¹	3x0,3 €
Anticuerpo conjugado ⁴ (10µL/5 mL)	3,6 €	Anticuerpo conjugado ⁴ (20µL/10 mL)	7,2 €
Substrato (3 mL)	3x2,5€	Substrato (6 mL)	3x5 €
Total	15,5 €	Total	36,39 €
Por muestra, óptimo (96x3)	0,054 €	Por muestra, óptimo (240x3)	0,05 €
Por muestra, posible (50x3)	0,1 €	Por muestra, posible (150x3)	0,08 €

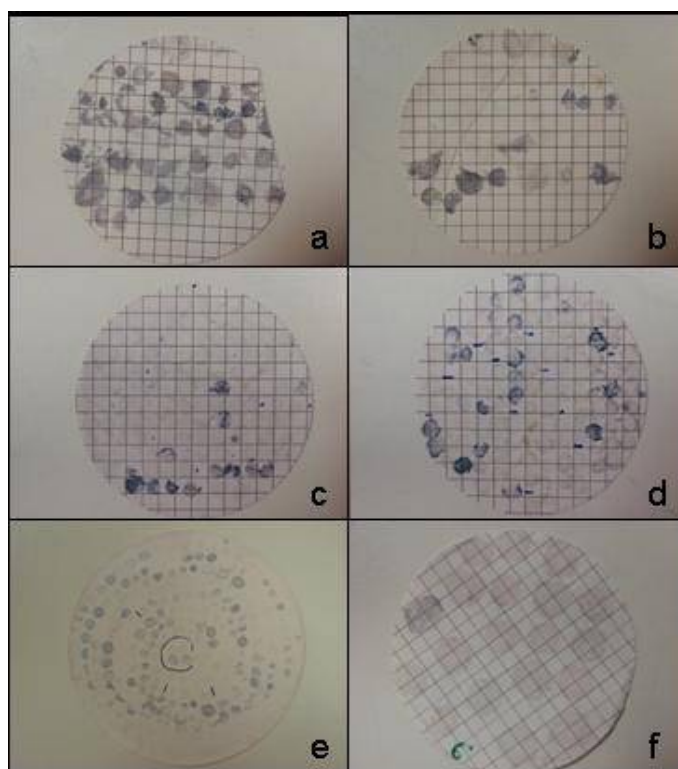


Figura 3.7 Membranas DIP reveladas (4,5 cm Ø salvo e); a y b: membrana con impresiones irregulares, sucias, alteradas y/o quebradas; c y d: membranas con un número óptimo de impresiones, ordenadas, claras; e: membrana de 9 cm con un total de 240 muestras bien ordenadas aprovechando el espacio; f: membrana con impresiones de brotes de tubérculos recién brotados, ordenada pero pocas muestras por membrana.

El protocolo descrito para DIP-ELISA es una forma de análisis simple, barato, rápido, preciso, consistente y sensible que se ajusta perfectamente al trabajo en laboratorios con poco equipamiento como pueden ser los de una empresa de servicios/asesoría, una cooperativa o un agricultor con cierta entidad. Existen comercialmente otros sistemas mucho más rápidos, que pueden dar un resultado en 2 minutos (SpotCheck® de ADGEN, por ejemplo) pero que tienen un coste elevadísimo por muestra por lo que sólo sirven para casos excepcionales; además son recomendables para brotes de tubérculo y en la actualidad no hay para PLRV que es la virosis más grave. Los métodos de detección molecular tienen mayor sensibilidad pero no están suficientemente estandarizados y si no se llega a cierta escala todavía no pueden competir en precio de reactivos, facilidad de realización y, sobre todo, para el uso que se indica en este trabajo, necesidades de infraestructura (Martin *et al.*, 2000). El DIP-ELISA permite, a bajo coste y con un mínimo de medios, el análisis sencillo de muchas muestras y por tanto puede ser utilizado por agricultores o extensionistas para estimar el estado sanitario de patata de siembra en variedades y regiones donde no hay patata de siembra certificada y, en este caso, para garantizar un reemplazo seguro. Los kits de inmunoimpresión como los que se comercializan en España para otros virus por empresas como Plant Print SL (CTV, TSWV, TYLCV, PFBV) han tenido un buen resultado comercial a juzgar por los años que llevan en el mercado y todos ellos se utilizan en planta (viveros o campo). Además de para el uso propuesto, hay casos en los que la inmunoimpresión es especialmente útil como alternativa a DAS: análisis ocasionales de pocas muestras de campo dado que las membranas se pueden cortar a medida y usar recipientes pequeños para reducir el gasto de reactivos (mejoradores, depuración en producción de patata de siembra certificada), también para control de calidad en inspecciones de patata de siembra o en mercado. Es evidente que la posibilidad de hacer las impresiones en campo/almacén, sin destruir el material vegetal para posibles contra-análisis o de almacenar membranas ya impresas para procesarlas más tarde da mucha flexibilidad y permite reducir costes al realizar muchos análisis al mismo tiempo reutilizando reactivos. Asimismo, en investigación permite el análisis rápido/económico de muchas muestras en estudios de seguimiento epidemiológico (incluso con impresiones hechas ya en campo), comprobaciones de transmisión de virus en cámaras sin toma de muestras y para la detección de virus a diferentes tiempos tras la ruptura de la dormancia. En un reciente estudio comparativo (Gawande *et al.*, 2011) se concluye que de todas las técnicas evaluadas la combinación de la impresión en

membranas con la PCR (Print Capture (PC) - RT-PCR) fue la técnica más simple, económica y fiable y no necesita anticuerpos y largos procesos de extracción de RNA. Por tanto, el futuro pasa por la combinación de la impresión en campo con una mejora sustancial de la sensibilidad gracias a los métodos moleculares (Cambra *et al.*, 2000b; Gawande *et al.*, 2011), que permita analizar de forma fiable el cultivo antes de cosecha; ello podría dar lugar a un cambio radical en la forma de trabajar de los agricultores en la producción de patata de siembra certificada y también una gran mejora para el agricultor que produce su propia patata de siembra: se podría hacer una estimación fiable de la calificación del cultivo y, en caso de superar los máximos de virosis, decidir destinarlo a consumo pero permitiendo al tubérculo alcanzar mayor calibre y por tanto obtener una producción rentable.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Banttari, E.E., y Goodwin, P.H. 1985. Detection of potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). *Plant Disease* 69: 202-205.
- Bravo-Almonacid, F., Haim, L., y Mentaberry, A. 1992. Rapid immunological detection of potato viruses in plant tissue squashes. *Plant Disease* 76: 574-578.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Camarasa, E., y Asensio, M. 1991. Detección y localización del virus de la tristeza (CTV) y del virus de la Sharka (PPV) mediante inmunoimpresión directa-ELISA. III Reunión científica de la Sociedad Española de Fitopatología. Ed. SEF, Diputación General de Aragón. Zaragoza, P: 55 (Resumen).
- Cambra, M. Camarasa, E., Gorris, M.T., Roman, M.P., Asensio, M. y Pérez, E. 1994. Detección de proteínas estructurales de virus mediante inmunoimpresión-ELISA y su uso en diagnóstico. *Investigaciones Agrarias; Fuera de serie* 2: 221-230.
- Cambra, M. Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A., y Colomer, M. 2000a. Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using monoclonal and recombinant antibodies. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*. 34-41.
- Cambra, M. Olmos, A. Gorris, M.T., Marroquín, C., Esteban, O., Garnsey, S.M., Llauger, R., Batista, L., Peña, I., y Hermoso de Mendoza, A. 2000b. Detection of

- citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissue and single aphids. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside: 42-49.
- Chao, J.A., Rosende, O. y Cabaleiro, C. 2002. Uso de inmunoipresión ELISA para realizar controles de calidad de patata de siembra. XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería 12-17 septiembre.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. Journal of general Virology 34: 475-483.
- Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Segura, A. y Cabaleiro, C. 2006. Detection of grapevine leafroll viruses using Direct immuno-printing (DIP)-ELISA. Proceedings of the XV International Congress of virus and Virus-like diseases of the Grapevine. Stellenbosh, Southáfrica, 2-7 April.
- Gabler, J., Kacergius, A. y Jovaisiene, Z. 2004. Detection of *Phomopsis vaccinii* on blueberry and cranberry in Europe by direct tissue blot immunossay and plate-trapped antigen ELISA. Journal of Phytopathology 152: 630-632.
- Gawande, A., Shukla, S.J., Chimote, V.P., Kaushal, N., Kaundal, P., Garg, I.D., y Chimote, K.P. 2011. Development of PCR-based techniques for the detection of immobilised PVY virions. Journal of Plant Pathology 93 (1): 127-132.
- Garsey, S.M., Perman, T.A., Cambra, M., y Henderson, C. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: Moreno, P. Da Graa, J.Timmer, M.W. (eds). Proc. 12th Conference. Int. Organization Citrus virol., IOCV, Riverside: 39-50.
- Gugerli, P. y W. Gehriger. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. Potato Research 23(3): 353-359.
- Guzmán, M. Caro, M. y García, Y. 2002. Técnica de Inmunoimpresión en membranas de nitrocelulosa. Una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PVX, PVY, PVS y PLRV que infectan a la papa (*Solanum* spp.). Revista Colombiana de Biotecnología 4(2): 45-51.
- Hampton, R., Ball, E. de Boer, S. 1990. Serológicoal methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS Press, St Paul, MN,USA.
- Hawkes, R., Niday, E., y Gordon, J. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Annals of Biochemistry 119: 142-147.

- Hu, J.S., Sether, D.M., Liu, X.P., y Wang, M. 1997. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawai. *Plant Disease*, 81 (10): 1150-1154.
- Hsu, H.T., Lawson, R.H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. *Plant Disease* 75: 292-295.
- Koenig, R., y Paul, H.L. 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *Journal of virological Methods* 5: 113-125.
- Lin, H.T., Hsu, Y.H., y Hsu, H.T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a Mycoplasmas-like organism by direct tissue blotting in nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
- Lin, Y., Rundell, P.A., Xie, L. y Powell, C.A. 2000. *In situ* immunoassay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* 84(9): 937-940.
- Lizarraga, C. 1989. Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by modified indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). *Plant Disease* 73(1): 11-14.
- Makkouk, K.M., Hsu, H.T y Kumari, S.G. 1993. Detection of three plant viruses by Dot-Blot and Tissue-Blot Immunoassays using chemiluminiscent and chromogenic substrates. *Phytopathology* 139: 97-102.
- Makkouk, K.M., y Comeau, A. 1994. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology* 100: 71-80.
- Makkouk, K.M. y Kumari, S.G. 2002. Low-cost paper can be used in tissue-blot immunoassay for detection of cereal and legume viruses. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 275-278.
- Mallik, I., Anderson N.R., y Gudmestad, N.C. 2012. Detection and differentiation of Potato Virus Y strains from potato using Immunocapture Multiplex RT-PCR. *American Journal of Potato Research* 89(3): 184-191.
- Martin, R.R., James, D. y André L'évesque, C. 2000. Impacts of molecular diagnostic on plant disease management. *Annual Review Phytopathology*. 38:207-39.
- Powell, C.A. 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology* 77: 306-309.
- Samson, R.G., Allen, T.C., y Whitworth, J.L. 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *American Journal of Potato Research* 70(3): 257-265.

- Shepard, J.F. y Clafin, L.E. 1975. Critical Analyses of the Principles of Seed Potato Certification. *Annual Review Phytopathology* 13: 271-293
- Slack, S.A. y Singh, R.P. 1998. Control of viruses affecting potatoes through seed potato certification programs. En: Hadidi, A., R.K. Khetarpal, y H. Koganezawa (Eds). *Plant Virus Diseases Control*. APS press, St. Paul, MN, USA. Capítulo 19.
- Smith, F.D., y Bantari, E.E. 1987. Dot-ELISA on nitrocellulose membranes for detection of potato leafroll virus. *Plant Disease* 71: 795-799.
- Spiegel, S. y Martin, R.R. 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers y microtubers by the polymerase chain reaction (PCR) and ELISA. *Annals Applied Biology* 122: 493-500.
- Weidemann, H.L. 1988. Rapid detection of potato viruses by dot-ELISA. *Potato Research* 31(3): 485-492
- Whitworth, J.L., Samsom, R.G, Allen, T.C., y Mosley, A.R. 1993. Detection of potato leafroll virus by visual inspection, direct tissue blotting and ELISA techniques. *American Journal of Potato Research* 70(6): 497-503.
- Whitworth, J.L., Mosley, A.R. y Reed, G.L. 2000. Monitoring current season potato leafroll virus movement with an immunosorbent direct tissue blotting assay. *American Journal of Potato Research* 77: 1-9.

CAPITULO 4

CAPITULO 4: Utilización de cultivos borde y aceites para el control de la transmisión de PVY en campos de patata para reemplazo en A Limia (Ourense).

RESUMEN

En la producción de patata para reemplazo, como en la producción de patata siembra certificada, los virus de transmisión no persistente, sobre todo el PVY, son los más difíciles de controlar. A nivel de agricultor, hay medidas de control complementarias a las que marca la normativa de producción de patata de siembra certificada que pueden ayudar a conseguir los menores niveles posibles de PVY. En 2001 se planteó un ensayo con dos cultivos borde (soja y maíz), en 2003 un ensayo utilizando aceites y en 2004 un ensayo combinando ambas técnicas: evaluación del maíz como cultivo borde y de 3 aceites – dos vegetales y un mineral – además de un insecticida piretroide. Los cultivos borde en 2001 no protegieron el cultivo de la transmisión de PVY; el aceite mineral redujo significativamente la incidencia de PVY en 2003 y también fue el de mejor comportamiento, junto con el de soja, en 2004 aunque en este año el efecto dominante en la reducción de la transmisión de virus fue el cultivo borde de maíz que dio lugar a sólo un 11% de tubérculos infectados frente al 30% de la parcela con borde labrado. Ni los aceites ni los bordes ocasionaron fitotoxicidad u otros efectos negativos en la producción. El estudio de la distribución espacial de las plantas con virus indica un gradiente hacia la zona de la finca donde hay otros cultivos de patata y agrupaciones significativas de plantas virosadas en los bloques y parcelas próximos a los ensayos vecinos de patata.

Palabras clave: patata, pulgón, PVY, cultivo borde, maíz, aceites

INTRODUCCIÓN

La utilización de patata de siembra libre de los principales virus es sin duda el mejor método de control para el productor de patata de consumo (Jayasinghe y Salazar, 1998; Slack y Singh, 1998; Ellisèche *et al.*, 1999) ya que las infecciones durante el cultivo, a no ser que sean muy tempranas y masivas, no tienen repercusión en la producción y, en muchos casos ni siquiera se detectan en la planta a media estación.

Los virus de transmisión no persistente son los que plantean más problemas a la hora de producir patata de siembra certificada y lo son aun más cuando se pretende producir patata para reemplazo ya que la localización de las parcelas difícilmente podrá ser tan alejada de las zonas cultivo y a altitudes tan elevadas como se hace en la producción de tubérculo certificado. Los insecticidas sistémicos que se aplican en siembra para el control de vectores de virus y otros insectos pueden limitar las poblaciones de vectores y evitar la adquisición y transmisión de los virus que, como

PLRV, necesitan un tiempo de latencia para poder ser transmitidos (transmisión persistente); pero los insecticidas sistémicos, aunque controlan la colonización de pulgones, no controlan la infección por PVY. Los alados provenientes del exterior de la parcela de cultivo – que ni siquiera tienen por qué colonizarlo – tienen tiempo de transmitir el/los virus no persistentes antes de morir (Ioannou y Iordanou, 1987).

Entre los métodos que se han propuesto para limitar la transmisión figuran, además de los insecticidas, distintos tipos de medidas como el uso de, productos químicos repelentes, acolchados reflectantes, mallas anti-pulgón y también el uso de aceites y de cultivos borde (Khurana y Garg, 1998).

Se ha demostrado que los aceites minerales son efectivos contra algunas virosis al interferir en la transmisión no persistente por pulgones. Los estudios realizados sobre este aspecto abarcan numerosos trabajos para el control de PVY en patata (Simons y Zitter, 1980; Ioannou y Iordanou, 1987; Bell, 1989) o en plantas de tabaco (Gibson y Cayley, 1984; Powell, 1992); control de PVY y CMV en pimiento (Marco, 1993; Collar y Fereres, 1999); TEV (*Tobacco etch virus*) (Wang y Pirone, 1996); potyvirus WMV-2 (*Watermelon mosaic virus*), PRSV-W (*Papaya ringspot virus* tipo W) y ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) en sandía (Webb y Linda, 1993); LSV (*Lily symptomless virus*) y LMoV (*Lily mottle virus*) en lirio (Asjes *et al.*, 2002); CeMV (*Celery mosaic virus*) en apio (Traicevski *et al.*, 2002); TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) en tomate (Clift *et al.*, 2002).

Varios autores han constatado que la adquisición – principalmente – pero también la inoculación de PVY por pulgones se ve afectada por el aceite que permanece en la superficie de las hojas (Simons y Zitter, 1980; Powell, 1992; Wang y Pirone, 1996; Collar y Fereres, 1999; Martín *et al.*, 2006). Esto puede deberse al hecho de que con la adquisición del virus el estilete del pulgón tiene ocasión de contactar con el aceite durante la penetración y retirada del estilete de la epidermis de la planta, mientras que por el contrario, durante la inoculación, el único contacto está durante la penetración en la fase de prueba. Además, el aceite mineral podría alterar el comportamiento de prueba y alimentación de los pulgones, puesto que se ha observado que *M. persicae* requiere un mayor tiempo de pre-prueba sobre las plantas tratadas con aceite que sobre las sin tratar (Simons y Zitter, 1980). Otros estudios explican que los aceites reducen la deposición de ninfas, disminuyen la alimentación del floema o aumentan la salivación y la alimentación en el xilema (Perring *et al.*, 1999).

Los aceites vegetales que se extraen de los frutos o de las semillas de plantas oleaginosas se han utilizado menos que los minerales tanto en el control de insectos plaga como en el control de la transmisión. El aceite de soja es el más estudiado y prometedor como pesticida (Sams y Deyton, 2002) porque produce asfixia por bloqueo del transporte de oxígeno y es, por tanto, útil en el control de insectos como *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *M. persicae*, y del ácaro *Tetranychus urticae*. Varela *et al.* (2003) estudiaron su efecto sobre el control del pulgón *M. persicae*. Los productos comerciales Codacide® y Fasta®, a base de aceite de colza, se ha comprobado que reducen significativamente la plaga de *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) en limón (Beattie *et al.*, 2002). También se ha observado que este aceite reduce la transmisión no persistente de CMV en pimiento (Martín *et al.*, 2004) y de PVY en patata (Martín *et al.*, 2006). Los aceites vegetales presentan frente a los minerales ventajas como su menor fitotoxicidad, menor toxicidad para las personas y menor persistencia en el agroecosistema (Calpouzos, 1966).

El empleo de cultivos borde, que actúan como barreras vegetales y como “trampa” para virus no persistentes durante la cata de los pulgones vectores es otra de las técnicas de control cultural (Fereres, 2000). Los pulgones tienden a colonizar los bordes de los campos porque es mayor el contraste entre las plantas verdes y el suelo oscuro y porque el viento los deposita en esas zonas (Difonzo *et al.*, 1996). Es posible reducir la incidencia de vectores rodeando el cultivo susceptible con otro de mayor porte de modo que los pulgones aterricen o pierdan la carga infectiva sobre él (Avilla *et al.*, 1996; Difonzo *et al.*, 1996; Fereres, 2000). El cultivo borde debe cumplir una serie de requisitos: (1) ser fácil de sembrar, (2) no requerir equipo especializado, (3) ser compatible con las prácticas de producción, (4) no ser huésped de los virus, (5) ser cultivable en la misma época, (6) tener mayor altura que la patata, (7) ser atractivo para pulgones y (8) no incrementar sus poblaciones. Las experiencias con cultivos borde no siempre han sido positivas: barreras de maíz, girasol y sorgo empleadas por Avilla *et al.* (1996) no fueron muy efectivas respecto a la disminución de PVY y CMV en pimiento aunque el maíz mostró los mejores resultados en reducción de infección; sin embargo, los pulgones *M. persicae* y *A. gossypii* sujetos a un periodo de adquisición de 5 minutos sobre inóculo, habían reducido significativamente la transmisión de PVY y CMV al pimiento tras probar en el sorgo o maíz. En un ensayo con bordes de sorgo, guisante o sorgo + aceite mineral, no se redujo la incidencia de PVY en pimiento pero los

rendimientos mejoraron (Rieche y Fereres, 1999). En patata de siembra, Difonzo *et al.* (1996) utilizaron sorgo, trigo y soja como cultivos borde, siendo este último el más efectivo en uno de los años de estudio; incluso un borde de la misma patata reduce la dispersión del PVY hacia el interior de las parcelas de siembra por lo que es una práctica habitual no cosechar para siembra los tubérculos de las patatas de la zona del borde; sin embargo puede ser arriesgado utilizar como borde un cultivo que puede ser él mismo infectado con PVY y convertirse en fuente de infección (Difonzo *et al.*, 1996).

A la vez que comenzaba en el Instituto do Campo el programa de análisis de lotes de resiembra y que algunas empresas iniciaran en la provincia de Ourense producción de patata de siembra certificada, se hicieron una serie de trabajos previos para determinar las poblaciones de vectores de virus más frecuentes (Pérez *et al.*, 2004) y los virus con mayor presencia en la zona (Cabaleiro *et al.*, 2000). El PVY es, como en la mayor parte de zonas de producción de patata de siembra, el virus más frecuente, aunque también aparece el PLRV, tradicionalmente más problemático (Jayasinghe y Salazar, 1998; Khurana y Garg, 1998). Aunque los principales cultivares utilizados en la zona (Kennebec, Agria) tienen cierta resistencia a este virus, las infecciones mixtas de PVY con PLRV o PVX causan daños importantes por lo que es aconsejable que el nivel de virosis de la patata que se utiliza en siembra sea lo mas bajo posible.

Los agricultores clasificados como tipo 1 en el Capítulo1, están produciendo su propio tubérculo para siembra, siguiendo, en la medida de lo posible, las normas de producción de patata de siembra, pero en parcelas propias. Para compensar la imposibilidad de cumplir medidas como son la ausencia de cultivo de patata de consumo en las cercanías y una altitud elevada para disminuir las poblaciones de pulgones vectores, se evaluaron medidas de control adicionales que, más que limitar las poblaciones de vectores, limiten la transmisión de virus no persistentes. Se hicieron dos estudios preliminares, por un lado el uso de cultivos borde/trampa y por otro empleo de aceites y en 2004 se estableció un ensayo completo para evaluar la combinación de ambos y estudiar los posibles efectos en la distribución espacial de plantas virosadas y también en la cantidad y calidad de la producción (fitotoxicidad, calibres, etc).

MATERIALES Y MÉTODOS

Año 2001

En el año 2001 se estableció en la finca experimental del Instituto do Campo un ensayo para determinar el efecto de dos cultivos borde en la transmisión de PVY. El diseño del ensayo se basó en el utilizado por Difonzo *et al.* (1996) y consistió en dos parcelas (de 20 metros de ancho por 80 m de largo) separadas por un espacio en el que se situaron dos surcos con patata con niveles de PVY superiores al 40% como fuente de inóculo. En cada una de las parcelas se repartieron los tres tratamientos: 3 m de maíz o soja y en los extremos, por cuestiones prácticas, suelo labrado para las parcelas control. Las líneas de soja o maíz se distribuyeron al azar en las zonas centrales de tal forma que hubiera cuatro repeticiones de cada tratamiento. La siembra fue tardía (primeros de Junio), con patatas de la variedad Kennebec de calidad Elite (sin virosis detectadas en los análisis realizados). La destrucción de matas se realizó con el herbicida Reglone (Diquat 20% p/v 2,5 L·ha⁻¹) a finales de Agosto y la recolección y toma de muestras de tubérculo se hizo a finales de Septiembre.

Para evaluar el efecto borde de manera aislada no se realizaron tratamientos insecticidas ni en siembra ni a lo largo del desarrollo de cultivo. Se situó una trampa amarilla (Moerike) entre las dos parcelas y se recogieron muestras dos veces por semana desde Junio a Septiembre para conocer las poblaciones de potenciales vectores.

Al final del ciclo se analizaron mediante DIP-ELISA hojas de 40 plantas al azar en toda la parcela y se recogieron – siguiendo un esquema pre-establecido - 50 tubérculos por tratamiento y repetición para su análisis posterior. Los tubérculos que se almacenaron se analizaron a partir de diciembre por DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) y también por DIP-ELISA según protocolo descrito en el Capítulo 3.

Los datos de porcentajes de infección en los tubérculos almacenados se compararon entre sí mediante una prueba χ^2 .

Año 2003

En el año 2003 se estableció un ensayo de efecto de aceites en la transmisión de PVY en una parcela experimental situada en O Corgo (Lugo). La siembra se realizó el 1

de mayo, se utilizó patata de siembra de la variedad Bindje certificada A (prebrotada) a la que aun así se sometió a un análisis por DIP-ELISA de cada uno de los tubérculos para garantizar la ausencia de PVY. Se ensayaron dos tratamientos con aceites: un aceite mineral Sunspray Untrafine® (85% w/v Agrichem, Whittlesey, UK) que es un aceite de parafina formulado como un concentrado emulsionable; se utilizó al 1% (10 mL·L⁻¹) dosis considerada óptima después de estudios de eficacia y fitotoxicidad (Silvarrey *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003). Y un aceite de colza refinado de la empresa MOYRESA (Molturación y Refino, S.A., A Coruña, España) obtenido de semillas de *Brassica napus* L.) que se aplicó también al 1% (añadiendo un 10% de Tween 20® como agente emulsionante). Se aplicaron semanalmente desde la emergencia de las plantas hasta una semana antes de la eliminación (mecánica) de las matas a principios de agosto (8 tratamientos). Las aplicaciones se hicieron con una sulfatadora manual y la cantidad de caldo aplicado estuvo entre los 1000 L/ha de las primeras aplicaciones y los 1500 L/ha en las aplicaciones realizadas cuando las plantas cubrían completamente el terreno. Las 12 parcelas elementales constaban de 4 líneas de 7 plantas a las que se asignaron al azar los tratamientos con aceites y el control con agua y se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento. Se realizaron dos tratamientos con imidacloprid (50 mL/hL, Confidor® 20SL, Bayer, Mannheim an Rhein, Alemania) para el control de escarabajo (y pulgones) además de un tratamiento contra *Phytophthora infestans*. A primeros de agosto, antes de la eliminación manual de matas, se tomaron dos hojas por planta de las 10 plantas centrales de cada subparcela y se analizaron por DIP-ELISA para PVY. En septiembre se recogieron 6 tubérculos por planta y se almacenaron en sacos de rafia para su posterior análisis. Se analizaron dos tubérculos en enero y, en caso de no coincidencia, se analizaron otros dos tubérculos en febrero llegando, en algunos casos, hasta 6 análisis. El motivo de esa repetición de análisis es la constatación, en trabajos previos (Capítulo 3), de que no todos los tubérculos de una planta están infectados (o dan positivo) y de que el número de tubérculos que dan positivo por métodos serológicos aumenta a medida que crecen los brotes.

Los datos de porcentajes de infección en los tubérculos almacenados se compararon entre sí mediante una prueba χ^2 .

Año 2004

Tomando como preliminares los resultados anteriores, se decidió establecer en 2004, en la finca del Instituto do Campo, un ensayo combinado de efecto de cultivos

borde y tratamientos con aceites o insecticidas y un estudio de la distribución espacial de plantas virosadas para determinar la procedencia y dispersión del inóculo. La parcela limita al este con ensayos de patata, al oeste con ensayos de maíz y su tamaño podría aproximarse a la parcela tipo empleada por los agricultores que hacen su propia patata de siembra (“Producción tipo 1”, Capítulo 1).

Los tratamientos utilizados fueron el aceite mineral de verano Sunspray Ultrafine, al 1%; aceite refinado de colza (obtenido de semillas de *Brassica napus*) y de soja (obtenido de semillas de *Glicine max*), ambos de la mencionada empresa MOYRESA aplicados al 1% y el insecticida Cekumetrin 10EC (Cipermetrin 10% p/v), comercializado por la empresa Cequisa S.A. (Barcelona) a una dosis del 0,05%.

Se establecieron dos parcelas iguales, una rodeada completamente con un borde de cuatro filas de maíz (variedad PR38A24, ciclo 300) y otra con suelo desnudo como borde (labrado). La parcela se estableció el 29 de abril de 2004, la distancia entre filas fue de 75 cm y entre plantas de 32 cm. Para que el material vegetal de partida fuera idéntico en ambas parcelas, los tubérculos de siembra de la variedad Kennebec (categoría Elite Belga calibre 50/60 cm) se dividieron en dos y se adjudicó una mitad a cada parcela; los tubérculos se trataron con insecticida sistémico (ESCOCET[®], Imidacloprid 35% N; 40 cc/Qm en 1-1,5 L) como es habitual en la producción de patata de siembra, para control tanto de *Leptinotarsa decemlineata* como de pulgones. En cada parcela se hicieron cuatro bloques y en cada bloque se distribuyeron al azar 5 parcelas para los 5 tratamientos con aceites y controles: aceite mineral, aceites vegetales de soja y de colza, insecticida y una parcela control tratada con agua. Cada parcela experimental constaba de 5 filas de 10 patatas cada una (50 plantas) y se rodeó de una fila de borde de patata de igual variedad y categoría (2 líneas de borde en el centro). El manejo de la parcela (abonados, riegos, tratamientos contra *Phytophthora infestans*) se hizo en la forma habitual en la finca experimental. Los tratamientos con aceites se empezaron a dar cada semana a partir de la nascencia completa del cultivo de patata (28 de mayo). Se espaciaron los tratamientos a 10 días a partir del cuarto tratamiento momento en el que se detectó una disminución en el conteo de pulgones en las trampas amarillas situadas en la parcela.

El 27 de julio se hizo un muestreo aleatorio de tanteo para analizar PVY y PLRV en las hojas de las plantas de patata antes de la eliminación de matas con el herbicida Reglone (diquat 20% p/v 2,5 L/ha). Se analizaron 10 plantas de cada tratamiento, en

cada bloque y parcela. A lo largo de los bordes de las parcelas se tomaron al azar 5 muestras de los bordes SO y NE, y 10 de los bordes NO y SE. La detección de PVY y PLRV en hojas se realizó por DIP-ELISA con anticuerpos de la casa Loewe siguiendo el protocolo establecido en el Capítulo 3.

El día 22 de septiembre se levantó la cosecha y se tomaron 2 tubérculos por planta, en total 4000 tubérculos que se marcaron convenientemente para identificar su posición exacta en campo. Los tubérculos se mantuvieron hasta su brotación en cámara caliente y en semioscuridad. Se analizaron por DIP-ELISA por primera vez en cuánto los primeros brotes alcanzaban los 2 cm (mediados de diciembre) y se repitió el análisis dos meses y medio después (principios de marzo) a los tubérculos que habían resultado negativos y a todos los casos dudosos o no brotados en diciembre. Se marcaron las patatas para su posterior localización tras el revelado de las membranas, de modo que se pudiera identificar la parcela, bloque, tratamiento, fila y columna, de cada patata analizada. Con los resultados finales de los análisis de las 50 plantas por parcela frente a PVY y PLRV se hizo un mapa completo de la parcela, planta a planta, para el estudio de la distribución espacial de cada uno de los virus (gradientes de enfermedad y agrupaciones) y las infecciones mixtas siguiendo la metodología descrita por Campbell y Maden (1990) y ya utilizada por el equipo de investigación en diversos trabajos (Cabaleiro y Segura, 1997; Cabaleiro *et al.*, 2008). Se utilizó el programa PATCHY diseñado por Maixner (1993).

Los posibles efectos fitotóxicos de los aceites o perjudiciales de los bordes de maíz se evaluaron realizando mediciones con un fluorímetro (Opti-sciences CCM 200) en tres fechas a lo largo del ciclo del cultivo y también mediante una escala de grado de senescencia de las plantas (0, no agostado; 5 agostado total). Para estimar la producción de cada parcela se recogieron todos los tubérculos de las plantas de los 4,8 m² centrales de la parcela. Los tubérculos de cada subparcela se calibraron y se separó la producción en 4 calibres: <40 mm, 40-60 mm, 60-80 mm y >80 mm.

RESULTADOS

Año 2001

Los análisis realizados al final del ciclo vegetativo no dieron ningún resultado positivo para PVY, lo que indica que no hubo infecciones tempranas que son las únicas

que se detectan bien en planta por métodos serológicos a final de ciclo. En la trampa Moericke se recogieron, a lo largo del ciclo, 3560 pulgones (Fig. 4.1), de los cuales más de 3000 fueron especies del género *Aphis* y sólo 53 fueron *Myzus persicae* y no se observaron colonias en el cultivo. Estas cifras son muy superiores a otros años de los que se dispone de datos (Pérez *et al.*, 2004). La eliminación de matas se hizo antes del pico de final de verano (25 de julio), antes de ese pico la media recogida en las trampas estuvo en torno a los 120 pulgones por fecha de recogida siendo el máximo en época de riesgo el del muestreo del 23 de Julio, con 246 pulgones. Parece que esas poblaciones tardías de pulgones, a pesar de no ser un pico muy alto, dieron lugar a una transmisión importante de PVY porque en los análisis de los tubérculos brotados se detectaron niveles de PVY en torno al 40% de media. No hubo diferencias entre los tubérculos de las plantas de las zonas con distintos cultivos borde y sin borde para Penélope y Kennebec ($\chi^2 = 2,6$ y $\chi^2 = 2,4$ respectivamente), pero sí entre ellas, con porcentajes en torno al 57% de PVY en Penélope frente al 23% en Kennebec ($\chi^2 = 18,3$). La distribución espacial de plantas que adquirieron el PVY no indicó ningún gradiente hacia las zonas labradas ni fue menor en la zona interior.

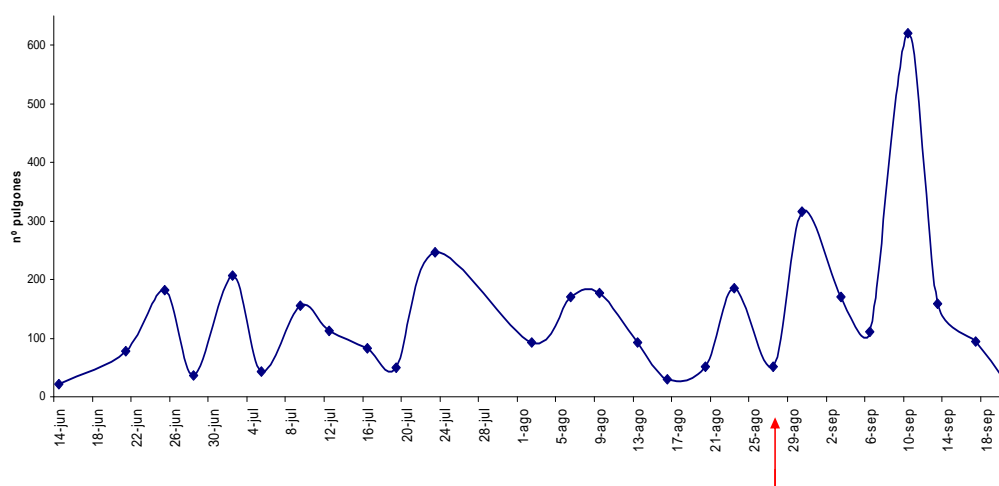


Figura 4.1 Capturas totales de pulgones en la trampa Moericke de La Laguna, próxima al ensayo de 2001. Muestreos 2 veces por semana. Flecha roja: herbicida de contacto para eliminación de matas de patata.

Año 2003

Los resultados de los análisis realizados a hojas tomadas al final del ciclo vegetativo y a varios tubérculos por planta en distintas fechas tras su brotación, se

muestran en la figura 4.2. Sólo el aceite mineral redujo significativamente ($\chi^2 = 26,5$) las transmisiones tempranas, que parecen haber sido importantes, puesto que el virus se ha detectado claramente por DIP-ELISA en los brotes que empezaban a agostar. En los análisis realizados en enero a los tubérculos que iniciaban su brotación el número de positivos aumentó significativamente en todos los tratamientos, pero se mantuvieron las diferencias a favor del aceite mineral; los valores medios de tubérculos infectados están en torno al 49% para el testigo, 47% para el aceite de colza y 28% para el aceite mineral, pero como no siempre coinciden los resultados de los análisis de los distintos tubérculos y se considera una planta positiva con que uno de los tubérculos de positivo, los valores totales, por planta, fueron 75%, 68% y 43%, respectivamente (Fig. 4.2). En todos los casos se mantuvieron las diferencias entre el aceite mineral y el testigo mientras que el aceite vegetal no redujo la transmisión. La presencia de pulgones fue importante en cultivos hortícolas y frutales cercanos observándose alados ocasionalmente en las plantas de patata, pero no colonias.

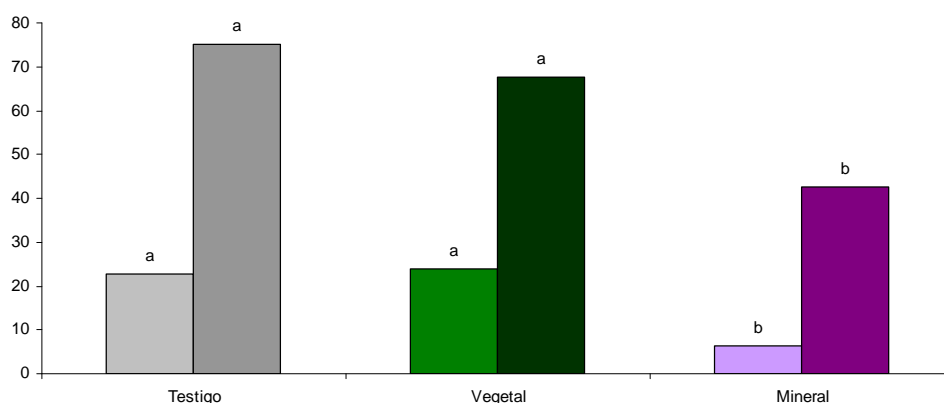


Figura 4.2 Ensayo de O Corgo 2003. Porcentaje medio de PVY en planta a finales de julio de 2003 (colores claros) y en tubérculo (análisis global por planta) en enero/febrero de 2004 (colores oscuros). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,01$ (contraste χ^2).

Año 2004

Virosis

Los resultados de los análisis de virosis realizados en hoja antes de cosecha se muestran en el mapa de situación de las parcelas (Fig. 4.3). Aunque el número de plantas con PVY es bajo en este primer análisis, se observa ya una mayor presencia del

virus dentro de la parcela sin bordes (2 plantas positivas frente a 6, de un total de 200 plantas analizadas en los dos casos). Los bordes de la parcela sin maíz presentaron el mayor número de positivas. Sólo se detectaron 2 plantas positivas de PLRV en la parcela sin maíz dentro de la subparcela del bloque 3 tratada con aceite de soja.

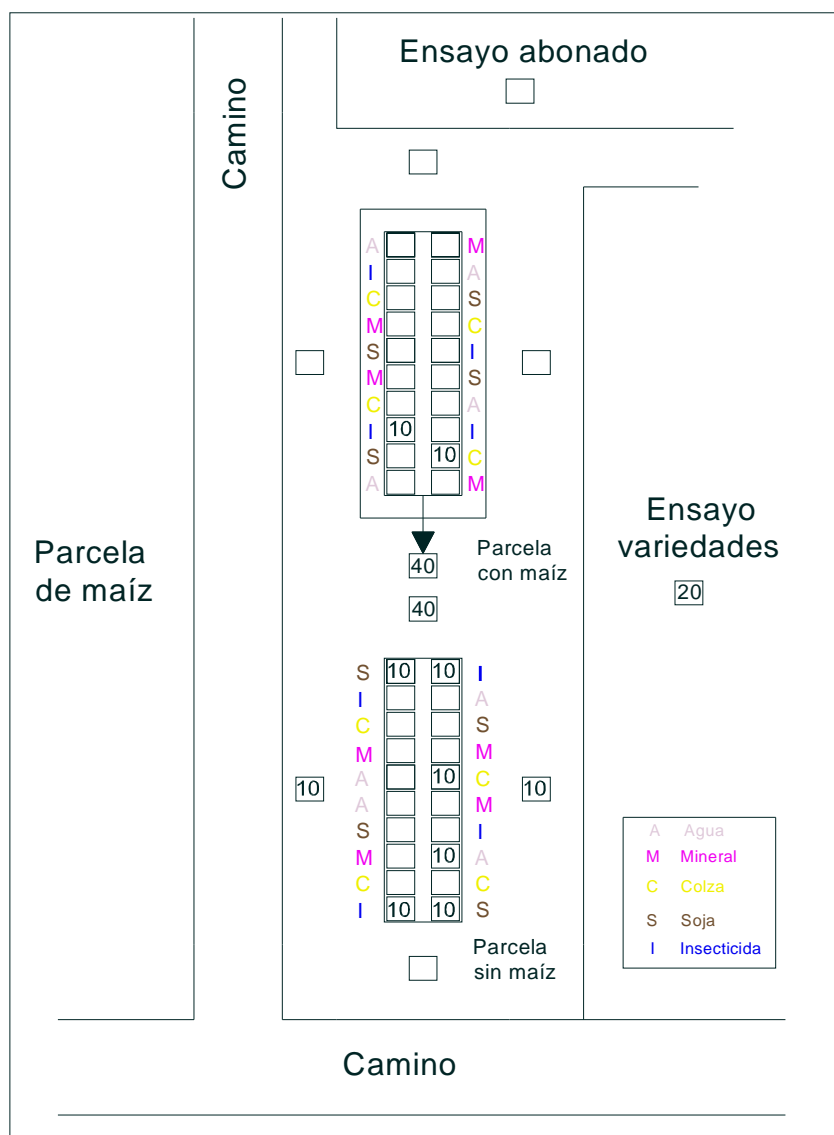


Figura 4.3 Plano de localización de la finca de ensayos en el Instituto do Campo en 2004 y mapeo de infecciones tempranas. Porcentaje de plantas infectadas por PVY (análisis en hoja antes de cosecha) en las parcelas de ensayo y en cultivos de patata contiguos (ensayos de variedades y abonado). Los recuadros vacíos indican 0% de infección.

Tras el análisis de brotes de los tubérculos, a nivel global la incidencia de PVY (19,8%) fue significativamente mayor que la de PLRV (2,5%) y hubo pocas infecciones mixtas (1,2%). Por tratarse de datos en porcentaje de positivos de los 50

tubérculos/parcela elemental, se analizaron mediante una prueba χ^2 comparando borde, bloque (situación de las parcelas) y tratamiento respecto a la presencia o ausencia de PVY, PLRV e infección mixta por planta analizada. Cuando se analizó la parcela completa sólo existieron diferencias significativas para PVY (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Resultados del contraste χ^2 para presencia de virus (PVY, PLRV y ambos) en el ensayo de 2004.

Efecto		PVY	PLRV	PVY+PLRV
BORDE	Valor χ^2	110.905	0.521	1.531
	P	0.000*	0.470	0.213
	g.l.	1	1	1
	Valor χ^2	43.055	5.208	4.680
BLOQUE	P	0.000*	0.131	0.183
	g.l.	3	3	3
	Valor χ^2	26.933	1.293	0.695
	P	0.000*	0.874	0.947
ACEITES	g.l.	4	4	4

La parcela con borde de maíz redujo significativamente el número de plantas positivas de PVY (9,2% vs 30,4% en sin maíz) (Figuras. 4.4 y 4.5). Comparando dos a dos los tratamientos mediante la prueba χ^2 hubo diferencias en el bloque 1 de la parcela con maíz y en los bloques 2, 3 y 4 de la parcela sin maíz (Fig. 4.4).

Analizando las dos parcelas por separado, cuando no hay un cultivo borde hay un efecto notable de la posición (bloque) de las parcelas en la incidencia del PVY pero no de PLRV. Los dos bloques próximos a la parcela de ensayos de variedades de patata tuvieron la mayor incidencia (Fig. 4.4). Los tratamientos con aceite mineral y de colza disminuyeron significativamente el nivel de transmisión del PVY en la parcela sin maíz. El aceite de colza controló mejor en el bloque con mayor presión de virosis (el 4) y el aceite mineral fue el de mejor comportamiento general. En la parcela con borde de maíz los niveles de incidencia tanto de PVY como de PLRV fueron similares en toda la parcela y solamente se apreciaron diferencias significativas en uno de los bloques en el que todos los tubérculos de las plantas tratadas con el aceite mineral fueron negativas para PVY.

Para PLRV se observó un cierto efecto borde aunque no estadísticamente significativo, pues en cualquiera de los tratamientos salvo el control (agua) fue menor el porcentaje de virosis en la parcela con maíz (1,6% vs. 2,8%).

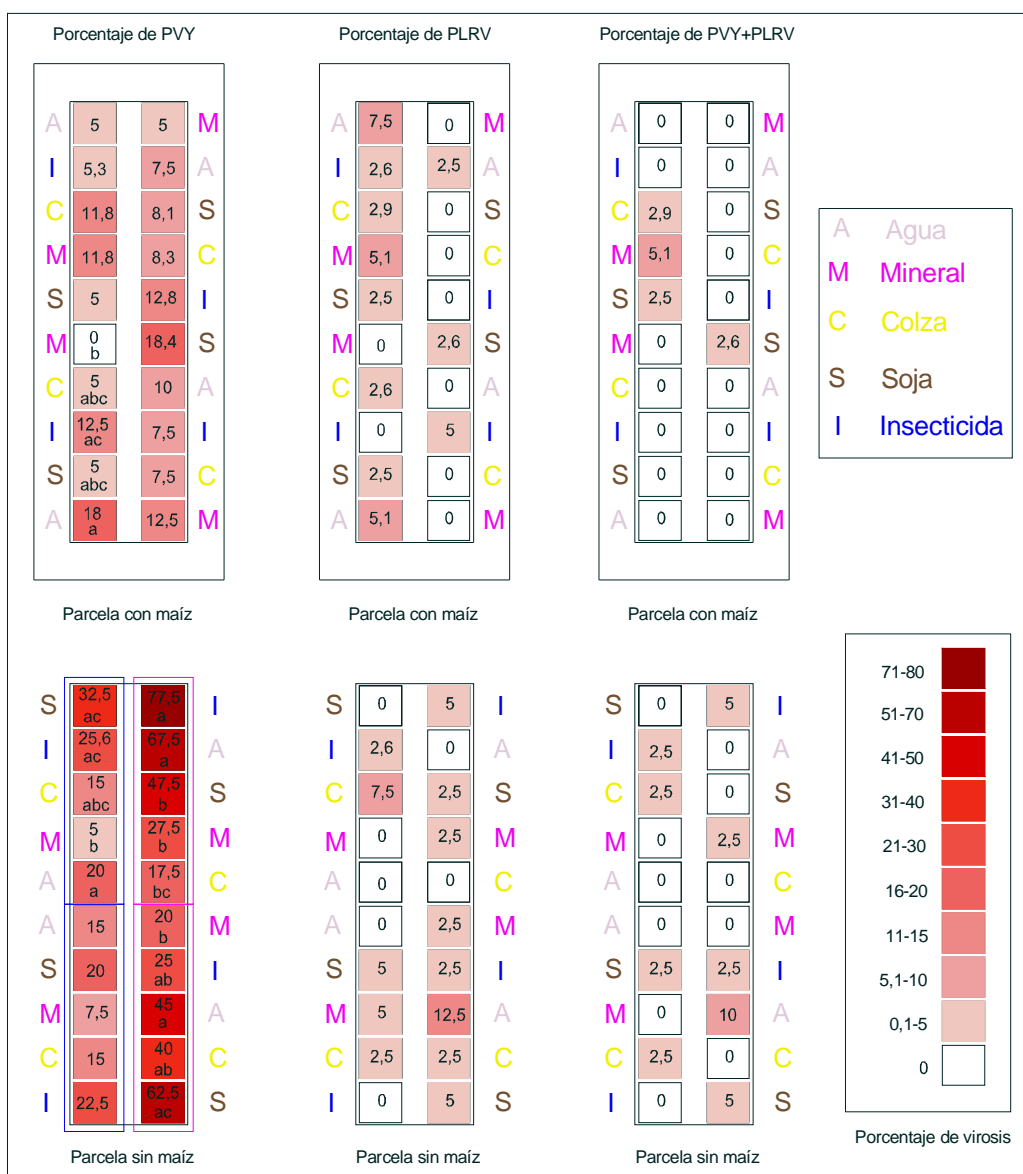


Figura 4.4 Porcentajes de plantas con tubérculos positivos para PVY, PLRV e infección mixta. Colores distintos de borde en los bloques indican diferencias significativas ($P < 0,05$) comparados dos a dos con la prueba χ^2 . Letras distintas dentro de cada bloque indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) comparados dos a dos con una prueba χ^2 . La escala de color rojo decreciente indica los distintos niveles (%) de incidencia de cada una de las virosis analizadas.

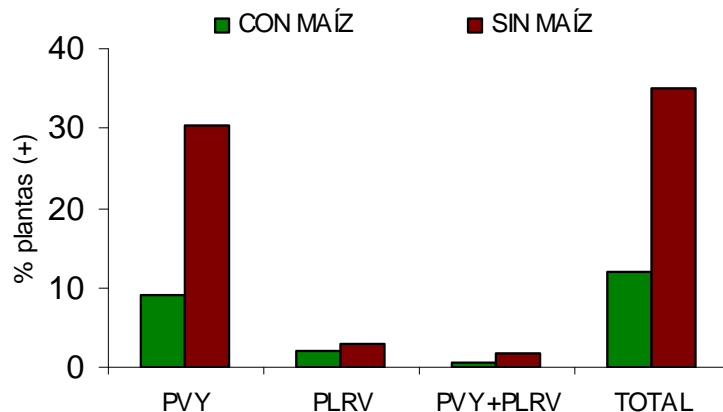


Figura 4.5 Porcentajes de PVY, PLRV, infecciones mixtas y total virosis en las parcelas con y sin borde de maíz en el ensayo de 2004.

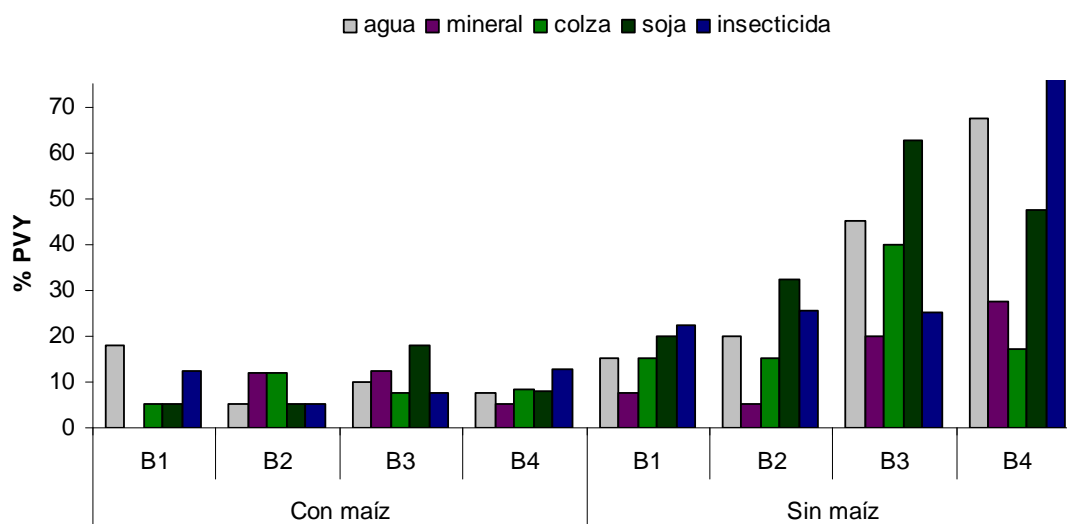


Figura 4.6 Niveles de PVY en todas las subparcelas de cada uno de los bloques de las parcelas con o sin borde de maíz del ensayo de 2004.

El estudio de la distribución espacial de plantas virosadas (Fig. 4.4 y tabla 4.2), mostró un importante gradiente de plantas que fueron infectadas durante el verano con PVY hacia la zona Este del conjunto de las dos parcelas (con y sin borde) y, menos marcado, hacia el Sur, justo las dos zonas en las que hay patata de consumo. No hubo ningún tipo de gradiente a nivel global de plantas con PLRV. Considerando las dos parcelas por separado, en la que tiene borde de maíz la distribución de plantas con PVY fue bastante homogénea, pero en la parcela con borde labrado hubo un claro gradiente

hacia el Este y hacia el Norte. Las infecciones mixtas PVY+PLRV, a nivel de toda la parcela presentaron un gradiente significativo hacia el Este, aunque dado el escaso número de plantas con infección mixta no se aprecia muy claramente en el mapa de la parcela de la figura 4.4.

También se hizo un estudio de agregación bidimensional (datos no presentados) en el que se apreciaron agrupaciones significativas (focos) de plantas con PVY desde 2 x 2 plantas y muy marcado a nivel subparcela (5 x 10) y bloque (50 x 5) en la parcela sin bordes. En el caso de PLRV los focos son más pequeños y con poca diferencia de tamaño entre el mínimo y el máximo foco significativo.

Tabla 4.2 Pendientes e interceptos de las rectas de regresión de los gradientes de enfermedad relacionando la incidencia de virosis con la posición de la fila y columna de las plantas cuyos tubérculos se analizaron para PVY y PLRV; el análisis se hizo utilizando el modelo lineal^a, para los datos de las parcelas con y sin borde de maíz. Las flechas indican la dirección del gradiente.

Virus	Parcela		n ^c	b	a	R ² ^b
PVY	Entera	f→	200	0.1295	7.1641	1.000***
		c↓	10	2.0729	8.6120	0.9896*
	Con maíz	f	100	0.0512	7.4961	0.8246ns
		c	10	0.3235	8.0964	0.4639ns
	Sin maíz	f→	100	0.1551	37.5861	0.9918*
		c↑	10	3.7859	9.0889	.9942**
PLRV	Entera	f	200	0.0107	1.3973	0.8760ns
		c	10	- 0.0203	2.5454	0.1164ns
	Con maíz	f	100	0.0106	2.5288	0.4497ns
		c	10	- 0.1396	2.6164	0.4429ns
	Sin maíz	f	100	0.0261	1.7028	0.8185ns
		c	10	0.0966	2.4707	0.6916ns
Mix	Entera	f→	200	0.0098	0.3016	0.9515*
		c	10	- 0.0166	1.4602	0.2093ns
	Con maíz	f	100	0.0045	0.5393	0.3277ns
		c	10	- 0.1327	1.6554	0.6865ns
	Sin maíz	f	100	0.0097	1.3257	0.4641ns
		c	10	0.0968	1.2687	0.7100ns

^a I = a × D + b; I: % virosis; D: Distancia de filas (f) y columnas (c) desde borde; a: intercepto; b: pendiente;

^b ns= no significativo; *, **, *** significativo con P< 0,05, P<0,01, P<0,001, respectivamente;

^c Número de filas y columnas que determinan el tamaño de la parcela evaluada;

Efectos de los tratamientos en el estado general del cultivo, producción y calidad

Los niveles de clorofila en hoja crecieron desde la primera medida a la segunda y, posteriormente, coincidiendo con el inicio del agostamiento de las plantas, se produjo un nuevo descenso. No se apreciaron manchas o necrosis marginales que pudieran indicar un efecto fitotóxico de los aceites y tampoco se apreciaron, aparentemente,

diferencias en la tonalidad de verde que pudieran indicar un descenso en el contenido en clorofila. Sólo las plantas tratadas con el piretroide tienen un contenido en clorofila ligeramente superior al resto (Fig. 4.7).

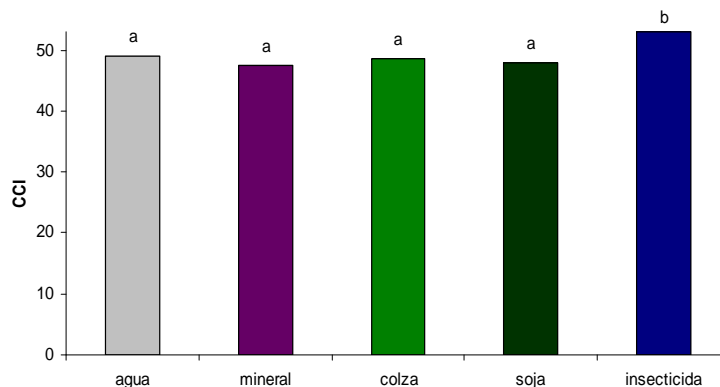


Figura 4.7 Índice medio de contenido en clorofila (CCI) en hoja para los distintos tratamientos a lo largo del verano en el ensayo de 2004. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según un Modelo Lineal General Univariante y test de Tukey b.

En la tabla 4.3 se muestra el resultado del análisis estadístico de los datos de agostamiento de las plantas de patata. A nivel global no hubo diferencias según borde, bloque o tratamiento pero los tratamientos dieron lugar a diferencias significativas en el nivel de agostamiento, aunque parece que también existe una relación entre el nivel de agostamiento y el de PVY (Fig. 4.8).

Tabla 4.3 Resultado del análisis estadístico de datos de agostamiento del ensayo de 2004 mediante un Modelo Lineal General Univariante

Parcela	Efecto	gl	F	P
Entera	Borde	1	1,192	0,296
	Bloque	3	2,527	0,107
	Tratamiento	4	1,850	0,184
	Borde x Bloque	3	1,214	0,347
	Borde x Trat	4	4,399	0,020*
	Bloque x Trat	12	0,548	0,845
Sin maíz	Tratamiento	4	8,766	0,001**
Con Maíz	Tratamiento	4	0,705	0,601

gl: grados de libertad; F: Fisher; p: probabilidad;

*, ** significativo con $p < 0,05$ y $0,01$ respectivamente

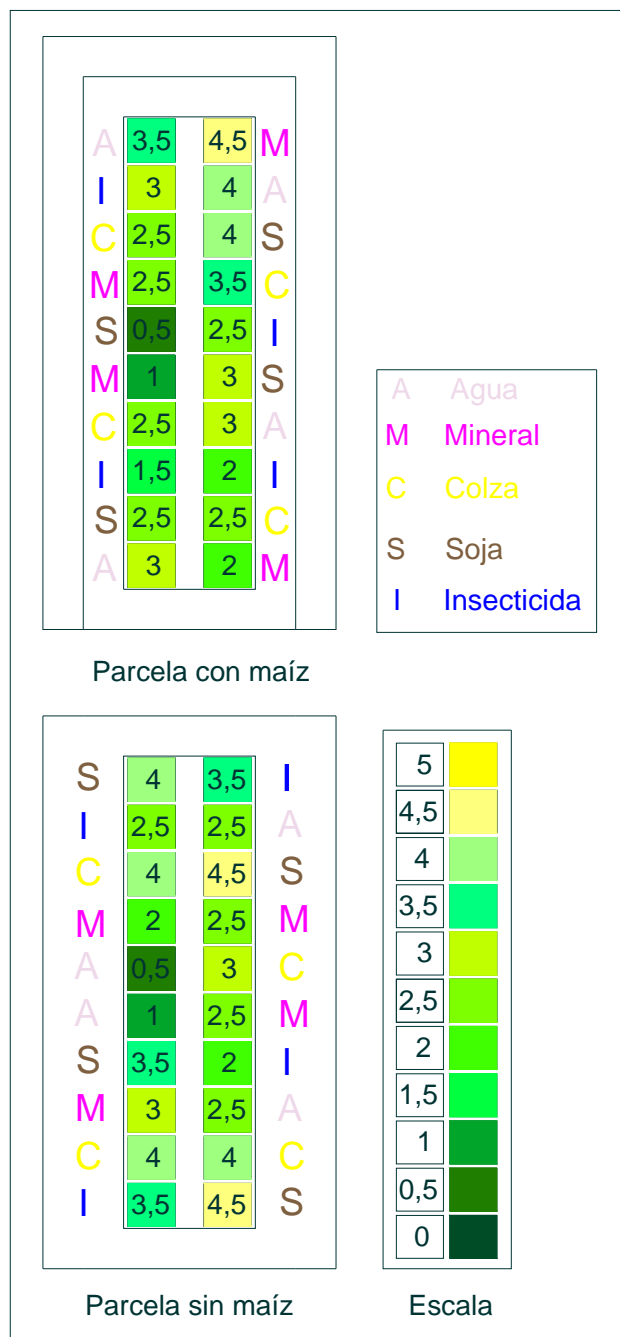


Figura 4.8 Mapa de las parcelas del ensayo de 2004 con los colores verde oscuro a amarillo fuerte, asignados a la escala de agostamiento descrita en Materiales y Métodos.

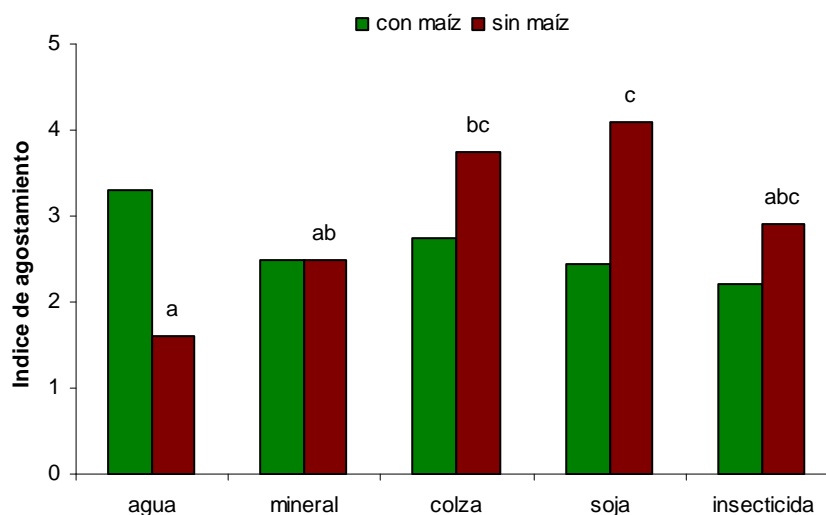


Figura 4.9 Comparación del índice de agostamiento por parcela y tratamiento (0-5 de menor a mayor agostamiento) en el ensayo de 2004. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según un Modelo Lineal General univariante y test de Tukey b.

El análisis estadístico de datos de producción bruta no mostró diferencias entre parcelas, bloques y tratamientos pero hubo interacciones entre el efecto borde y los bloques y tratamientos, debido a las diferencias algo más importantes en la parcela sin borde (Tabla 4.4). Las producciones más bajas se dieron en los bloques 3 y 4 de la parcela sin borde, por ser los que tuvieron mayores porcentajes de PVY. Es por ello que en la figura 4.10 se han representado los niveles de virosis y producciones correspondientes de la misma forma que se hizo en el Capítulo 2 observándose un efecto significativo, a pesar de que la mayoría de las infecciones se produjeron de forma tardía. Este efecto bloque, debido a los niveles de PVY, no afectó significativamente a los tratamientos con aceites, comportándose igual en todos los bloques (Fig. 4.12) con producciones mayores en las plantas tratadas con insecticida. La presencia de un borde de maíz en la parcela no sólo no fue perjudicial sino que las producciones totales fueron algo mayores a nivel global principalmente debido al incremento de producción en las parcelas tratadas con insecticida (Fig. 4.12).

El calibre óptimo para patata de siembra es el de 35 a 45 mm y es también aceptable hasta 60 mm; el porcentaje de tubérculos mayores de 60 mm, que serían aprovechados para patata de consumo, fue bajo (Fig. 4.12). Los tratamientos con aceites y el cultivo borde no afectaron al calibre aunque el porcentaje de patatas con calibre menor de 40 fue ligeramente superior en las parcelas sin borde. Considerando las

producciones totales hay un cierto efecto del borde, no significativo, debido a que las producciones fueron ligeramente mayores en la parcela con maíz (Fig. 4.11); pero para los calibres preferentes para siembra no hubo diferencias (Fig. 4.12).

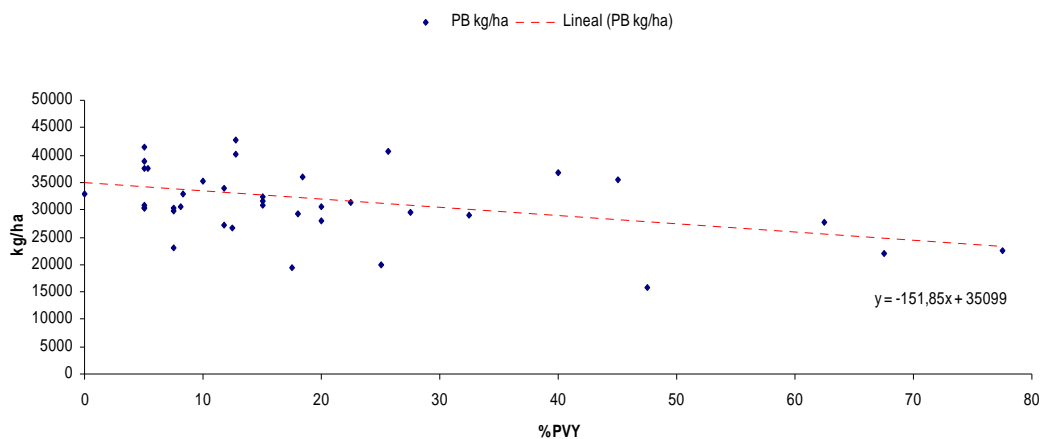


Figura 4.10 Porcentaje de PVY en los tubérculos cosechados frente a la Producción Bruta por ha en el global de las dos parcelas en el ensayo de 2004; recta / ecuación de regresión lineal. Coeficiente de Spearman, $\rho = -0,305$; $p = 0,05$.

Tabla 4.4 Resultado del análisis estadístico de datos de producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) según un Modelo Lineal General Univariante.

	gl	F	P	sig
Borde	1	1,504	0,308	ns
Tratamiento	4	1,211	0,356	ns
Bloque	3	1,535	0,347	ns
Borde x Trat	4	6,505	0,005	*
Borde x Bloque	3	4,234	0,029	*
Trat x Bloque	12	1,484	0,252	ns

gl: grados de libertad; F: Fisher; p. probabilidad; * significativo con $p < 0,05$; ns: no significativo

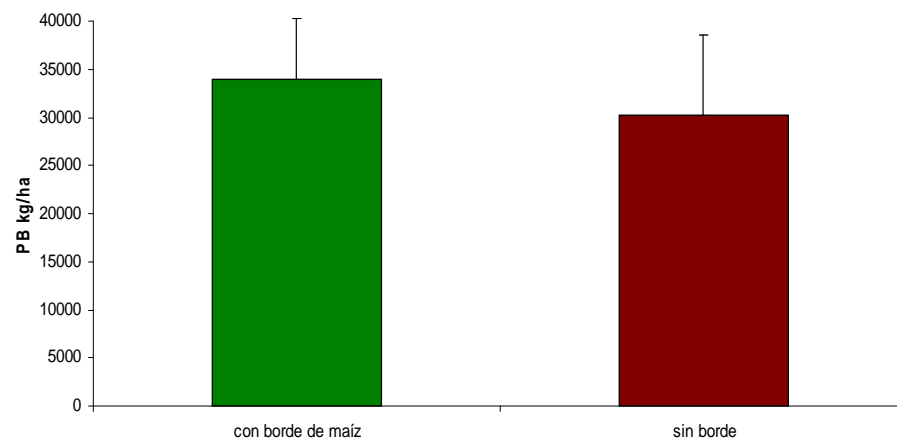


Figura 4.11 Producción bruta ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, media \pm dt) en la parcela con borde de maíz y en la rodeada de suelo desnudo en el ensayos de 2004 en la finca experimental del Instituto do Campo en A Limia.

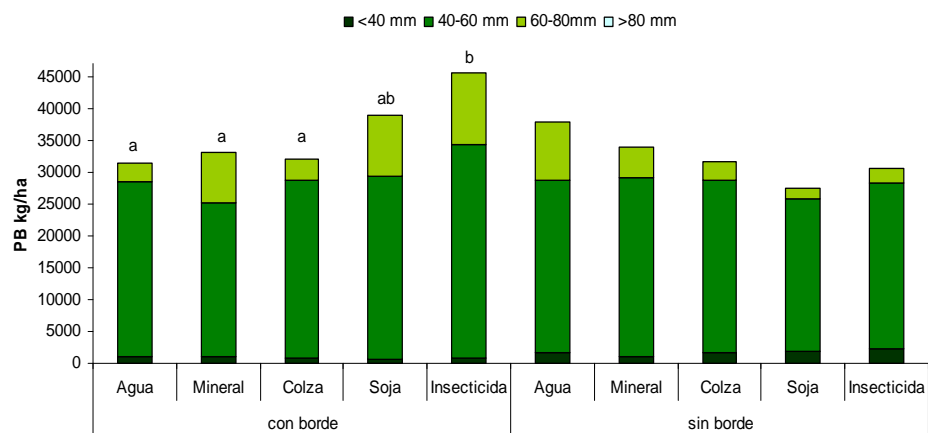


Figura 4.12 Comparación de la producción media ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de patata de siembra según los tratamientos aplicados en la parcela con o sin borde de maíz en el ensayo de la finca experimental del Instituto do Campo en 2004. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ según el test de Tuckey b entre tratamientos en la parcela con borde de maíz.

DISCUSIÓN

La producción de patata para siembra debe hacerse en unas condiciones muy controladas para conseguir que el nivel de virosis esté por debajo de los niveles exigidos en la legislación vigente para la producción de patata certificada o de los umbrales admisibles de daños en el caso de la patata de reemplazo. Ioannou y Iordanou (1987) afirman que es posible producir patata de siembra con niveles aceptables de virosis sin la aplicación de medidas de control químico contra los pulgones, utilizando adecuadamente una serie de medidas culturales de tipo sanitario. Sin embargo, en muchas zonas tradicionales de cultivo de patata de siembra ha habido muchos problemas, especialmente con el control de PVY (Legorburu, 2000).

Para el estudio de medidas de control de estos virus es interesante trabajar en zonas con un cierto nivel de vectores e inóculo que de hecho se parecen más a las que podrían utilizar los agricultores que hagan su propia patata de siembra; por ello la mayoría de los ensayos se hicieron en la finca del Instituto do Campo, situado en la antigua laguna de Antela en A Limia (Ourense). En esta parcela, además, están situadas desde 2000, trampas de captura de pulgones y se dispone por tanto de varios años de curvas de vuelo e identificación de poblaciones vectoras (Pérez *et al.*, 2004). Se asume que existe una correlación entre los pulgones capturados en las trampas y la cantidad de plantas infectadas en el cultivo, pero en cada zona hay una gran variación en las fechas y niveles de capturas cada año (Pérez *et al.*, 2004) por lo que sólo teniendo series muy largas de datos se pueden hacer predicciones (Sigvald, 1998; Legorburu *et al.*, 1999; Thackray y Jones, 2002) y establecer estrategias de control (Ioannou y Iordanou, 1987). Cuando se estableció el ensayo de 2001 apenas se estaba iniciando la toma de datos y en 2004 se disponía ya de algo más de información. Los vectores e inóculo de PVY no han faltado en ninguno de los ensayos, especialmente en 2001, con capturas en la trampa de La Laguna, superiores a la media y a cualquier otra trampa de la zona ese año; de hecho, en 2001 probablemente las líneas de plantas con alto nivel de PVY situadas en medio de las dos parcelas no hubieran sido necesarias pues los niveles de transmisión de virus fueron muy elevados. Además, el diseño de Difonzo *et al.* (1996) tan “abierto” probablemente ha hecho que el efecto borde no fuera apreciable. En el ensayo de 2004, las filas de maíz cerrando por completo la parcela, fueron mucho más efectivas; aunque

también dificultaron algo el manejo de un cultivo como la patata en el que es necesario “entrar” para aplicar los tratamientos fitosanitarios.

Los aceites por si solos tuvieron algún efecto positivo puntual, tanto en el ensayo de 2003 como en el de 2004, pero el descenso en la transmisión no se ve compensado por el elevado número de tratamientos necesario para conseguir que las plantas estuvieran protegidas durante su crecimiento. En el ensayo de 2004 los aceites tampoco redujeron la presencia de pulgones alados sobre el cultivo (Martín *et al.*, 2006). El insecticida piretroide es el tratamiento que mejor controló la colonización de plantas por alados en la parcela sin borde (Martín *et al.*, 2006), pero como ocurrió en ensayos en Chipre (Ioannou y Iordanou, 1987) éste no interfirió en la transmisión del virus, pues las parcelas tratadas con el piretroide presentaron niveles de virosis similares al control. Algunos autores afirman que los insecticidas, especialmente piretroides, cuando se aplican en dosis subletales pueden aumentar el nivel de transmisión porque los pulgones aumentan su actividad (Khurana y Garg, 1998; Satapathy, 1998). El aceite mineral fue el único que disminuyó de forma significativa la transmisión de PVY en el ensayo de 2003, donde la presión de inóculo fue muy alta por la cercanía de huertos en los que la presencia de *Aphis fabae* y otras especies de ese y otros géneros no colonizantes era importante. Los aceites minerales se han utilizado en la prevención de la transmisión de virus no persistentes como PVY con buenos resultados en patata y otros cultivos según muchos autores ya citados en la Introducción y en el ensayo de 2004 fue también el de mejor comportamiento a nivel general frente a PVY pero también el aceite de colza redujo significativamente la incidencia de PVY respecto a la parcela control y en el bloque de mayor incidencia de virosis. En el estudio de Varela (2003) sobre aceites en pimiento, con bajos niveles de transmisión, el aceite de colza fue capaz de suprimir la inoculación de *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Martín *et al.*, 2004). El aceite de soja, que otros autores han utilizado con éxito para controlar *M. persicae* (Sams y Deyton, 2002), en este ensayo no controló la transmisión de PVY y en muchas de las parcelas los niveles de incidencia fueron similares a los del control. En ensayos de transmisión realizados en condiciones controladas en los últimos años, el aceite mineral siempre fue el que tuvo un mejor comportamiento pero también los aceites de colza, soja y pescado disminuyeron la transmisión (Martín *et al.*, 2004 y 2006).

En algunos casos se ha visto que la utilización de aceites en el control de virosis produce problemas de fitotoxicidad en algunos cultivos (Hodgkinson *et al.*, 2002),

incluida la patata de siembra (Gibson y Cayley, 1984) lo que puede dar lugar a bajada de rendimiento en cosecha (Simons y Zitter, 1980). Sin embargo, hay también casos en los que no se ha observado efecto fitotóxico o en los que la fitotoxicidad y disminución de rendimientos dependen de la concentración a la que se apliquen (Ioannou y Iordanou, 1987). En los trabajos previos realizados por nuestro equipo, si las dosis de aceite se mantenía en torno al 1% y se limitaba el número de aplicaciones, no se observaron efectos dañinos sobre grosellero negro o vid (Cabaleiro *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2005).

En estudios sobre aceites minerales Johnson y Hodgkinson (2002) comprobaron que su aplicación afectaba a la eficiencia fotosintética pues las hojas tratadas se oscurecen indicando que los espacios intercelulares están empapados de aceite. Algo similar ocurre en vid (Silvarrey, 1999). En los ensayos de 2003 y 2004 no se apreciaron manchas o necrosis marginales que pudieran indicar un efecto fitotóxico de los aceites; tampoco hubo, aparentemente, diferencias en la tonalidad de verde que pudieran indicar un descenso en el contenido en clorofila y así lo confirman los datos de CCI.

Tanto una aceleración del agostamiento, como un mal agostamiento, podrían indicar un efecto fitotóxico de los aceites. Los índices de agostamiento que se registraron en la parcela en 2004 no indican que el cultivo sufriera ningún efecto por el uso de aceites. El caso de las parcelas tratadas con aceite de soja que agostaron antes podría ser debido a que son también las que tienen una mayor incidencia de PVY ya que cuando se observa el esquema de la parcela con la escala de color, se aprecia ese mayor agostamiento coincidiendo con las zonas de mayores niveles finales de PVY.

El dato definitivo de ausencia de fitotoxicidad en patata fue la no existencia de variaciones en la producción total ni en los calibres comerciales de la cosecha. En otros ensayos en los que se utilizó aceite mineral tampoco se produjeron efectos sobre los rendimientos en patata de siembra siempre que no se utilizaran concentraciones mayores de 1,5% (Bell, 1989). En pimiento, la aplicación del aceite mineral consiguió controlar la transmisión no persistente de PVY y CMV en un 15% y aumentar los rendimientos un 22% por encima del control sin que se observen daños directos sobre el cultivo (Marco, 1993). Sin embargo, en sandía la aplicación de aceite mineral al 0,75% cada 4-5 días fue fitotóxica, hubo menos flores y la mayoría de las sandías cosechadas tuvieron un peso menor que el control; pero al reducir las infecciones tempranas de WMV-2, PRSV-W y ZYMV se redujeron los daños (Webb y Linda, 1993).

En los ensayos de 2001 y 2004 apenas hubo infecciones tempranas y sin embargo, en el de 2003, el nivel de virosis detectado en hoja a final del cultivo era ya muy alto, lo que indica que las infecciones se produjeron al inicio del cultivo, época que coincidió con los mayores ataques de *Aphis fabae* en *Vicia faba* presente en las cercanías de la parcela experimental. En 2004, las infecciones tempranas de PVY detectadas en hoja, fueron relativamente bajas, tanto en la parcela con maíz, como en la de borde labrado, pero ya significativamente superiores en esta última. Sin embargo, estas plantas infectadas en varias de las subparcelas y en los bordes pudieron ser fuente de inóculo interna para la posterior dispersión del virus. En esas primeras semanas tras la brotación de la patata, el borde de maíz estaba germinando y en todo caso no superaba en altura a la patata por lo que no parece estar implicado el borde como barrera en la prevención de la transmisión y es posible que sea la atracción por el color amarillo del maíz la que haya facilitado la pérdida de infectividad de los pulgones durante la cata. En los bordes de las parcelas sí se detectó un mayor número de plantas positivas por infecciones tempranas (40%), especialmente cerca de la zona labrada de separación entre las dos parcelas en las que posiblemente brotaron patatas “bortas” que quedaron de cultivos anteriores y que actuaron como fuente de inóculo antes de ser eliminadas (Jones *et al.*, 1996). También actuaron claramente como fuente de inóculo las patatas de los ensayos colindantes, situadas al Este y Sur de las parcelas estudio, puesto que se detecta un gradiente significativo de plantas con PVY en esta orientación del ensayo completo. El hecho de que en la orientación N-S se produjera el mayor nivel de virosis podría relacionarse también con la dirección de los vientos, aunque otros autores como Legorburu *et al.* (1999) en ensayos de patata de siembra no encontraron diferencias entre 4 trampas orientadas a los 4 puntos cardinales situadas a 25 m de cada campo de patata.

En este análisis del 27 de julio no se detectó ningún positivo (en planta) en las parcelas tratadas con aceite mineral por lo que este aceite parece haber tenido un buen efecto en la prevención de las infecciones tempranas.

Los cultivos borde, que en el ensayo de 2001 no evitaron la transmisión de PVY ni la de PLRV, tuvieron un efecto importante en 2004. Como se mencionó antes, el diseño del ensayo en 2001 quizá no fue el más adecuado y/o el nivel de inóculo fue excesivamente alto. No se encontraron diferencias entre soja y maíz y dado que el maíz es un cultivo habitual en A Limia, se consideró que era una mejor opción. Para Difonzo

et al. (1996) la elección de especies para el borde no afecta a la incidencia de PVY siempre que no sean huéspedes de este virus.

Considerando el ensayo entero, los valores totales de virosis detectados en tubérculo (PVY+PLRV) fueron 11,87% en la parcela con borde de maíz y 35,04% en sin maíz. Estaríamos produciendo, con este borde de maíz, patata de siembra próxima a la certificada B (<10%) en una zona de cultivo de patata de consumo y por lo tanto donde la presión de inóculo es importante. Como se vio en el Capítulo 2, en variedades como Kennebec, Agria y Fina de Carballo, niveles hasta el 15% son aceptables para un reemplazo, siempre que no presenten otros daños.

El ensayo de 2004, y el de 2003, se plantearon para el control de la transmisión de PVY al ser el virus con mayor presencia y más problemático en el cultivo de patata de siembra y susceptible de ser controlado con aceites por su transmisión no persistente, puesto que los aceites no ejercen control contra la transmisión persistente circulativa de PLRV (Simons y Zitter, 1980; Ioannou y Iordanou, 1987). El insecticida sistémico aplicado a los tubérculos en siembra controló satisfactoriamente el PLRV (2,5% de incidencia en tubérculo) pues aunque las poblaciones de vectores específicos de este virus fueron bajas, cuando en 2001 no se aplicó insecticida los niveles de infección por PLRV fueron altos y similares a los de PVY. Los pequeños focos dispersos de plantas infectadas con ese virus provienen seguramente de infecciones tardías pues el imidacloprid proporciona una protección de unas 10-12 semanas y el herbicida quemante se aplicó justo a las 12 semanas de plantación y a los rebrotes a las 14.

El maíz parece haber ejercido tanto de barrera contra los pulgones como de trampa en la que los pulgones redujeron su carga viral al realizar pruebas de reconocimiento de la planta (Avilla *et al.*, 1996). Los cultivos borde aparecen como un método efectivo y práctico para reducir la incidencia de PVY en generaciones tempranas de patata de siembra. Difonzo *et al.* (1996) probaron los bordes de soja, sorgo, trigo y patata en el control de PVY, reduciendo la infección en todos los casos (media de 2,7% vs. 6,8% en el testigo). En 2004 la utilización del cultivo borde además de reducir la incidencia de PVY en la parcela con borde de maíz, hace que ésta se reparta de forma más uniforme sin que haya gradientes significativos hacia ninguna zona de la parcela, probablemente por crear un ambiente más cerrado, sin corrientes.

En la parcela con borde de maíz el ambiente más protegido retrasó ligeramente el agostamiento al presentar las plantas una vegetación más desarrollada que en la parcela con el borde labrado. En un cultivo de patata de siembra esos retrasos en la finalización del ciclo no interesan pues en algunos casos puede ser necesario adelantar la eliminación de matas cuando se detecta un incremento de las poblaciones de pulgones y sería conveniente que la madurez de los tubérculos se hubiera alcanzado en ese momento. En todo caso el retraso no fue significativo y no hubo repercusiones en la cosecha, más bien todo lo contrario pues las producciones fueron ligeramente superiores a las de la parcela sin cultivo barrera. Ya en campo se había observado un mayor vigor en las plantas al parecer relacionado con el microclima favorable que se creó en la parcela rodeada por el maíz que llegó a alcanzar más de 2 m de alto. Ese mayor vigor y retraso en el ciclo podría haberse traducido en una menor producción o menores calibres puesto que todas las matas se eliminaron el mismo día, pero no fue así. La mayor producción puede deberse también, y los datos en la Figura 4.9 lo avalan, a la diferencia en el nivel de incidencia final de PVY, inferior en la parcela con borde de maíz. En ensayos realizados por Avilla *et al.* (1996) los cultivos barrera de maíz y girasol utilizados en pimiento, hicieron que disminuyera la producción por competencia y tuvieron que ser eliminados, pero se registró un 9% menos de infección global en la parcela con borde de maíz frente al control (suelo desnudo). Posteriormente, estos mismos autores, al aumentar la separación entre borde y cultivo a 2,5 metros en el ensayo con maíz y sorgo consiguieron evitar esa competencia y mejoraron las producciones, consecuencia también de un retraso de la infección de PVY y CMV.

El estudio de la distribución espacial de plantas con PVY en el ensayo de 2004 indica que la incidencia está relacionada con la posición de las parcelas de los tratamientos dentro de los bloques, de forma que los más cercanos a las esquinas reflejaron mayor porcentaje de virosis al ofrecer mayor superficie de “borde” al exterior y hay un claro gradiente, en la parcela sin borde de maíz, tanto hacia la zona próxima a otros ensayos de patata como hacia el terreno entre ambas parcelas en el que pudo haber patatas “bortas” y malas hierbas en algún momento que hicieran de fuente de inóculo y/o vectores. En general la incidencia de virosis está negativamente relacionada con la distancia a áreas sin cultivar o sin labrar (Maixner, 1993).

El estudio de la distribución espacial de los dos virus analizados y de la infección mixta nos confirmó que en todos los casos existieron agregaciones, lo común

en una transmisión vectorial (Maixner, 1993; Cabaleiro y Segura, 1997). Hay claras diferencias entre la dispersión de PVY y PLRV, por la incidencia diferente pero también por el tamaño de focos. En el caso de PLRV, con incidencia muy baja, los focos, de 2-3 plantas, fueron muy claros. Las plantas individuales con PLRV obedecen probablemente a la llegada de pulgones infectivos que llegaron a alimentarse en la planta pero murieron (por el insecticida sistémico) antes de hacer colonias que permitieran la dispersión a plantas vecinas. En el caso de PVY se distinguen focos desde tamaños muy pequeños pero el mayor grado de agregación se dió en focos grandes y cuando se hace el estudio para tamaño de foco igual a tamaño de bloque o de subparcela, se encontraron agrupaciones significativas que indican las diferencias entre tratamientos.

El estudio de la distribución espacial de plantas con virus es una herramienta válida para conocer los modos de transmisión, la existencia o no de vectores, la fuentes de inóculo internas y externas, los huéspedes alternativos y el efecto de las medidas de control (Maixner, 1993; Madden *et al.*, 2007). El estudio de los gradientes nos permite ver claramente el efecto del borde de maíz que “independiza” de alguna manera al cultivo de patata de las condiciones de su entorno. Un análisis antes de cosecha de un buen número de plantas permite detectar al menos las infecciones tempranas y descartar lotes para siembra sin realizar los análisis en tubérculo que, aunque por DIP-ELISA son rápidos y económicos, implican forzar la brotación o esperar a que se produzca para poder hacer un análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Asjes, C.J. y Blom-Barnhoorn, G.J. Use of agricultural mineral oils and pyrethroid insecticides to control aphid vector spread of lily symptomless virus and lily mottle virus in *Lilium*. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management*. University of Western Sydney. 547-551.
- Avilla, C., Collar, J.L., Duque, M., Hernaíz, P., Martín, B. y Fereres, A. 1996. Cultivos barrera como método de control de virus no persistentes en pimiento. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 22: 301-307.

- Beattie, G.A.C., Jacas, J., Nicetic, O. y Watson, D.M. 2002. Evaluation of rapeseed-based plant oils for control of citrus leafminer and their phytotoxicity to lemon. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management*. University of Western Sydney. 157-161.
- Bell, A.C. 1989. Use of oil and pyrethroid sprays to inhibit the spread of PVYN in the field. *Crop protection* 8: 37-39.
- Cabaleiro, C. y Segura, A. 1997. Field transmission of Grapevine Leafroll Associated Virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease* 81: 283-287.
- Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M. y Segura, A. 2008. Spatial analysis of epidemics of Grapevine leafroll associated virus-3. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 121-130.
- Cabaleiro, C., García-Calvo, L. y Álvarez, S. 2000. Virosis en el cultivo de patata en Xinzo de Limia (Ourense). Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en patata. Vitoria-Gasteiz 3-6 Julio.
- Cabaleiro C., García-Berrios, J.J. y Carcelén, E. 2003. Use of natural oils in protection of *Rubus* and *Ribes* crops. *OIBC IOBC/wprs Bulletin* 26(2), 197-202.
- Calpouzos, L. 1966. Action of oils in the control of plant disease. *Annual Review Phytopathology*. 4: 369-390.
- Campbell, C.L. y Madden, L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Ed. Wiley. USA. Capítulos 10 y 11: 253-329.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Clift, A.D., Singh, P., Bowyer, J., Rose, H., Tesoriero, L., Beattie, G.A.C. y Rajakulendran, V. 2002. Use of horticultural mineral oils to control tospovirus and phytoplasma-associated diseases of tomato. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management*. University of Western Sydney. 556-561.
- Collar, J.L. y Fereres, A. 1999. Mineral oil effect on *Myzus persicae* probing behaviour and subsequent PVY acquisition from pepper plants. VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Abstracts. Aguadulce. Almería. (Spain) 11-16 April 1999.
- Difonzo, C.D., Ragsdale, D.W., Radcliffe, E.B, Gudmestad, N.C. y Secor, G.A. 1996. Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato. *Annals of Applied Biology* 129: 289-302.

- Ellisèche, D., Merlet, J., Le Hingrat, Y., Groau, G. y Langlade, P. 1999. Producción de patata de siembra. En: Rouselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. (Eds.). La Patata. Mundi Prensa, Madrid. 423-456.
- Fereres, A. 2000. Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Virus Research* 71:221-231.
- Gibson, R.W. y Cayley, G.R. 1984. Improved control of PVY by mineral oil plus the pyrethroid cypermethrin applied electrostatically. *Crop protection* 3(4): 469-478.
- Hernández, S., Cabaleiro, C., Jacas, J. y Martín, B. 2002. El empleo de aceites minerales, vegetales y de pescado en el control integrado de plagas y enfermedades del viñedo. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 28: 223-237.
- Hodgkinson, M.C., Johnson, D. y Smith, G. 2002. Causes of phytotoxicity induced by petroleum-derived spray oil. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management. University of Western Sydney*. 170-178.
- Ioannou, N. y Iordanou, N. 1987. Prevention of the spread of Potato Virus Y in seed potatoes by mineral-oil sprays. Agricultural Research Institute. Ministry of Agriculture and Natural Resources. Nicosia, Cyprus. Technical bulletin 98.
- Jayasinghe, U. y Salazar, L.F. 1998. Present Status of Controlling Potato Leafroll Virus. In: Hadidi, A., Kherarpal, R.K. y Koganezawa, H. Eds. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 584-592.
- Johnson, D. y Hodgkinson, M.C. 2002. Some useful bioassays for guidance of petroleum-derived spray oil formulation. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management. University of Western Sydney*. 62-70.
- Jones, D.A.C., Woodford, J.A.T., Main, S.C., Pallet, D. y Barker, H. 1996. The role of volunteer potatoes in the spread of PVY^N in ware crops of cv. Record. *Annals of Applied Biology* 129: 471-478.
- Khurana, S.M.P. y Garg, I.D. 1998. Present status of controlling mechanically and non-persistently aphid-transmitted potato viruses. In: Hadidi, A., Kherarpal, R.K., and Koganezawa, H. Eds. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 584-592.
- Legorburu, F.J. 2000. Epidemiología y control de PVY. *Actas Congreso Patata 2000*: 473-475.
- Legorburu, F.J., Marquínez, R. y Ruiz de Gauna J.A. 1999. Spread of PVY in potato from an external source: Spatial and temporal patterns. VIIth International Plant

- Virus Epidemiology Symposium. Abstracts. Aguadulce. Almería (Spain) 11-16 April 1999.
- López, V., Cabaleiro, C., y Martín, B. 2003. Aceites vegetales, minerales y de pescado como productos alternativos a los plaguicidas de síntesis para el control de *Myzus persicae* Sulzer. Cuadernos de Fitopatología, 2º trimestre: 54-62.
- Madden, L.V., Hughes, G., y van den Bosch, F. 2007. The study of Plant Disease Epidemics. APS Press, St. Paul, Minnesota, 421 pp.
- Maixner, M. 1993. Spatial pattern analysis for epidemiological studies on grapevine diseases. 11th Meeting of the ICVG. Extended abstracts. Montreaux, Switzerland. 6-9 September.
- Marco, S. 1993. Incidence of nonpersistently transmitted viruses in pepper sprayed with whitewash, oil, and insecticide, alone or combined. Plant Disease 77(11): 1119-1122.
- Martín, B., Hernández, S., Silvarrey, C., Jacas, J.A. y C. Cabaleiro, C.. 2005. Vegetable, fish and mineral oils control grapevine powdery mildew. Phytopatologia Mediterranea 44(2): 223-237.
- Martín, B., Varela, I. y Cabaleiro C. 2004. Effects of various oils on survival of *Myzus persicae* Sulzer and its transmission of cucumber mosaic virus on pepper. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79(6): 855-858.
- Martín, B., Varela, I., Marnotes, S. y Cabaleiro, C. 2006. Use of various oils combined with low doses of insecticides for the control of *Myzus persicae* and PVY epidemics. Pest Management Science 62: 372-378.
- Pérez, P., García-Calvo, L., Martín, B. y Cabaleiro, C. 2004. Actividad de las potenciales especies vectores de virosis de patata en la zona de producción de Xinzo de Limia (Ourense). Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 30(3): 487- 496
- Perring, T.M., Gruenhagen, N.M. y Farrar, C.A. 1999. Management of plant viral diseases through control of insect vectors. Annual Review of Entomology 44: 457-481.
- Powell, G. 1992. The effect of mineral oil on stylet activities and PVY transmission by aphids. Entomology Experimental Applied 63: 237-242.
- Rieche, Y. y Fereres, A. 1999. Barrier crops to control non-persistently transmitted viruses of pepper crops in Spain. VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Abstracts. Aguadulce. Almería (Spain) 11-16 April 1999.

- Sams, C.E. y Deyton, D.E. 2002. Botanical and fish oils: history, chemistry, refining, formulation and current uses. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management*. University of Western Sydney. 19-29.
- Satapathy, M.K. 1998. Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. In: Hadidi, A., Kherarpal, R.K., y Koganezawa, H. Eds. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 188-195.
- Sigvald, K.R. 1998. Forecasting aphid-borne virus diseases. In: Hadidi, A., Kherarpal, R.K. y Koganezawa, H. Eds. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 172-187.
- Silvarrey, C. 1999. Uso de aceites en el control fitosanitario en viña. Proyecto Fin de Carrera Ingenieros Agrónomos. Departamento de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela.
- Simons, J.N. y Zitter, T.A. 1980. Use of oils to control Aahid-borne viruses. *Plant Disease* 64 (6): 542-546.
- Slack, S.A. y Singh, R.P. 1998. Control of viruses affecting potatoes through seed potato certification programs. In: Hadidi, A., Kherarpal, R.K., y Koganezawa, H. Eds. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 249-260.
- Thackray, D.J. y Jones, R.A.C. 2002. Forecasting aphid outbreaks and epidemics of Barley Yellow Dwarf Virus - A decision support system for a Mediterranean- type climate. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Abstracts. Aschersleben.(Germany) 12-17 May 2002.
- Traicevski, V., van Rijswijk, B., Hepworth, G., Ridland, P. y Moran, J. 2002. Influence of horticultural mineral oil on the incidence of celery mosaic potyvirus in celery. *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest and Disease Management*. University of Western Sydney. 552-555.
- Varela, I. 2003. Empleo de aceites en programas de manejo integrado en pimiento para el control del pulgón *Myzus persicae* (Sulzer) y de los virus no persistentes transmitidos por este vector. Proyecto Fin de Carrera Ingenieros Agrónomos. Departamento de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela.
- Varela, I., Cabaleiro, C. y Martín, B. 2004. Empleo de aceites de distinto origen, en programas de manejo integrado en pimiento para el control del pulgón *Myzus persicae* (Sulzer). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 30: 185-195.

- Wang, R.Y. y Pirone, T.P. 1996. Mineral Oil Interferes with Retention of Tobacco Etch Potyvirus in the Stylets of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 86 (8): 820-823.
- Webb, S.E. y Linda, S.B. 1993. Effect of Oil and Insecticide on Epidemics of Potyviruses in Watermelon in Florida. *Plant Disease* 77: 869-874.

CAPITULO 5

CAPITULO 5: Manejo del nitrógeno en cobertera en cultivos de patata de reemplazo

RESUMEN

Algunos síntomas de deficiencia mineral en patata son similares a los que inducen virus como PVY por lo que su efecto en la patata podría verse modificado por su estado nutricional. Un aumento en la fertilización nitrogenada se asume que enmascara los síntomas de PVY al aumentar el tamaño de las plantas y por tanto reduce las pérdidas. En 2008 y 2009 se plantearon ensayos de campo, en bloques al azar con 3 repeticiones, con Kennebec y en 2010 con Fina de Carballo, para intentar determinar el efecto del abonado nitrogenado en cobertera en el rendimiento de lotes de reemplazo con PVY. Se partió de lotes de patata Kennebec con buen estado sanitario y se hicieron lotes con 0%, 60% y 100% de PVY, todas con 0% de PLRV. Se abonó en cobertera con 75 / 75+50 / 0 uds de N. El ensayo de Fina de Carballo se hizo con lotes con 0 y 100% de PVY, que se abonaron en cobertera con 100 / 100+50 / 0 uds de N. En Kennebec no hubo respuesta al abono nitrogenado de cobertera ni interacciones entre N y nivel de virosis. El número de tubérculos, su tamaño y la materia seca fue similar y no afectó ni al estado sanitario final de la ni a los daños o deformaciones del tubérculo. En Fina de Carballo ni el virus ni el abonado de cobertera afectó a ningún parámetro de producción. La recomendación de incrementar el abonado N en cobertera cuando se utilizan lotes de reemplazo con niveles medios de PVY debería ser revisada a la vista de estos datos.

Palabras clave: patata, nitrógeno, virus, PVY, Kennebec, Fina de Carballo

INTRODUCCION

Los virus de la patata, y el PVY es uno de los considerados graves (Salazar, 2003), se consideran uno de los principales factores de disminución de producción en el cultivo incluso en variedades que no muestran síntomas importantes (Hane y Hamm, 1999; Whitworth *et al.*, 2006). La mayoría de las variedades cultivadas en la actualidad tienen un buen nivel de resistencia a PVY pero aun así, la normativa de certificación de patata de siembra exige valores mínimos de presencia de este virus. Las pérdidas de producción en variedades sensibles pueden superar el 50% (Spaar y Hamann, 1977; Nolte *et al.*, 2005) pero en otras variedades no se observan diferencias de altura de planta ni producción pero hay muchos factores que afectan a la expresión de síntomas (Draper *et al.*, 2002). Variedades como la Fina de Carballo, cuyo cultivo se mantiene desde antiguo en Galicia sin material para siembra certificado ni – hasta hace unos años - ningún tipo de saneamiento deben, necesariamente, tener un buen nivel de resistencia de campo a los virus importantes (García-Calvo, 2002).

Las interacciones entre nutrición mineral y virosis han sido documentadas desde antiguo y de esos trabajos se han podido derivar ciertas recomendaciones de fertilización “compensatoria”. La mayoría son trabajos antiguos y con ensayos controlados en los que se estudia un solo virus, un solo nutriente o una variedad y por tanto no dan necesariamente una información que se pueda generalizar (Hoveland *et al.*, 1954; Watson y Wilson, 1956). Algunos síntomas de deficiencia mineral se confunden con los que inducen virus como PVY o PLRV por lo que es lógico suponer que el efecto de un virus en la patata podría verse modificado por su estado nutricional (Hoveland *et al.*, 1954; Wilson, 1955; Leadershok, 2004). Por ejemplo, según Hoveland *et al.* (1954), los síntomas de enrollado tienden a ser enmascarados con una nutrición mineral equilibrada; y las pérdidas de peso seco de los tubérculos disminuyen cuando se aumenta la fertilización nitrogenada (Watson y Wilson, 1956). Los resultados de un estudio realizado por Ohms *et al.* (1977) indican que las recomendaciones de fertilizantes para los agricultores que usan semilla de Russet Burbank con bajo nivel o sin PVX, deberían ser diferentes de las que se hacen para agricultores que usan semilla de reemplazo con presencia de ese virus y, de hecho, incrementando el abonado nitrogenado mejoraron los rendimientos.

Las plantas procedentes de tubérculos con PVY se agostan antes, incluso desde mediados de julio, por lo que se asume que todo lo que sea capaz de alargar el ciclo, como por ejemplo abonados nitrogenados suplementarios tanto granulados como foliares, puede impedir que los tubérculos detengan su crecimiento antes de tiempo. Aumentos en la fertilización nitrogenada pueden enmascarar los síntomas de PVY porque aumenta el tamaño de las plantas y si las plantas responden al N extra puede incluso mitigar las pérdidas, pero pocos datos lo constatan, al menos en el caso de ese virus. Sin embargo, un mayor aporte de N en plantas con PLRV se vio que reducía considerablemente los síntomas en hojas y las necrosis del floema (Wilson, 1955). Whitworth *et al.* (2006) publicaron datos de uno de los pocos ensayos en los que se comparan los rendimientos de lotes de patata con distintos niveles de PVY bajo distintos niveles de fertilización nitrogenada; en sus ensayos, muy controlados, no se produjo esa disminución de pérdidas de rendimiento cuando se aplicó N extra y se comprobó que incluso puede perjudicar al rendimiento general una vez superados ciertos niveles incluso en variedades como la Russet Norkotah, en las que los síntomas de PVY son muy suaves. En otros ensayos, los efectos del nitrógeno, fósforo y potasio

en la tasa de asimilación neta y sus interacciones con infecciones virales fueron pequeñas y escasamente significativas (Watson y Wilson, 1956).

Como los virus se desarrollan solo en las células vivas de la planta, cualquier cambio en la fisiología del huésped se podría esperar que afecte a su multiplicación. En general, un aumento excesivo del aporte de N aumenta la susceptibilidad a patógenos, plagas y vectores de virus (Broadbent *et al.*, 1952; Jarvis, 1992; Meyer, 2002; Agrios, 2004) e incluso inhibe el crecimiento (MacNew, 1953). Como la proteína de la cápsida de los virus vegetales contiene tanto N como P, cabría esperar que esos dos elementos controlen su multiplicación y de hecho en algunos ensayos se vio que las plantas con aporte suficiente de N tenían muchas más partículas virales que las que se desarrollaron en plantas con deficiencia de N y que incluso en las plantas con crecimiento retardado por exceso de N, el virus se multiplicaba rápidamente. McNew hace una revisión en 1953 e inicia la controversia producida por una serie de ensayos en condiciones controladas en torno a la influencia de la fertilización en la multiplicación de virus en las plantas que aun sigue vigente en la actualidad (Datnoff *et al.*, 2007).

Una de las recomendaciones establecidas dentro de los criterios para valorar los lotes de patata para reemplazo (Capítulo 1), es la siembra condicionada a ciertas prácticas agronómicas, entre las que se encuentra el aumento de la fertilización nitrogenada en cobertera cuando PVY supera ciertos niveles; esa recomendación se hizo porque era una práctica habitual ya puesta en práctica por algunos agricultores y por los motivos expuestos al comienzo de la introducción. Dado que en A Limia hay una cierta tendencia e historial de fertilizaciones altas, lo que desde el punto de vista medioambiental por la contaminación de suelos y aguas con nitratos es un aspecto a tener muy en cuenta dentro de la Unión Europea (Leadershok, 2004), se plantearon ensayos de campo con Kennebec y Fina de Carballo para intentar determinar el efecto del abonado nitrogenado en cobertera en el rendimiento del cultivo y su interacción con el nivel de PVY en los lotes de reemplazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de campo con patata variedad Kennebec se hicieron en 2008 y 2009 en A Limia, lugar de Vilaseca (Trasmiras, Ourense), en fincas del agricultor

colaborador Antonio Fiz Alonso en el concello 83 y polígono 503 (primer año: parcela 1593 y segundo año: parcela 11099).

Se partió de lotes de patata de la variedad Kennebec con buen estado sanitarios general y con alto porcentaje de infección por PVY y bajo de PLRV. Cada año se analizaron todas las patatas de las partidas y se crearon lotes con 0, 60 y 100% de PVY, todas con 0% de PLRV; como la variedad se presupone que tiene una cierta resistencia, los niveles de virosis se eligieron altos para lograr un mayor contraste con las parcelas control. Los ensayos se completaron los dos años con una partida de patata certificada categoría A, como control.

1. Patata de reemplazo 0 % PVY.
2. Patata de reemplazo 60 % PVY.
3. Patata de reemplazo 100 % PVY.
4. Patata certificada.

Las parcelas se abonaron de fondo como es habitual en la zona para una producción de 35 - 45.000 Kg con:

- 1400 kg/ha de un complejo con equilibrio 1-2-3.
- 300 kg/ha de cloruro o sulfato de potasa al 50%.
- 300 kg/ha de N de nitrógeno de liberación lenta 26%.

La de cobertera, también los dos años, con nitrato amónico cálcico del 27 % aplicada de la siguiente forma a las parcelas experimentales:

1. Sin aporte de Nitrógeno en cobertera.
2. 75 uds. de N aplicadas a finales de junio (fertilización estándar).
3. 75 uds. de N aplicadas a finales de junio y 50 uds. de N a mediados de julio.

Las parcelas elementales fueron 4 surcos de 6 m de largo y se hicieron tres repeticiones por tratamiento (salvo en 100% y certificada en 2008). El cultivo se trató como es habitual en la zona (riegos, otros abonados, tratamientos fitosanitarios) salvo por los aportes de nitrato realizados antes de los primeros riegos. Se recogió toda la producción de 2 m de los dos surcos centrales de cada parcela/repeticion (3 m²).

En 2010 se hizo un nuevo ensayo, con la variedad Fina de Carballo, en la finca de la Xunta de Galicia gestionada por CTC en Laguna de Antela. Las 3 repeticiones se

hicieron en parcelas elementales de 4 surcos por 6 m de largo, de las que se cosecharon 4,5 m² de los surcos centrales. Se seleccionaron lotes de tubérculos con 0 y 100% PVY y sin PLRV a partir del material que la Consellería de Medio Rural recibía de NEIKER tras el saneamiento y primeras multiplicaciones. La fertilización de fondo fue común a todas según se indica más arriba y la de cobertera, con nitrato amónico cálcico del 27 % con las siguientes dosis y fechas de aplicación:

1. Sin aporte de Nitrógeno en cobertera.
2. 100 uds. de N antes del primer riego
3. 150 uds. de N: 100 antes del primer riego y 50 antes del segundo riego.

RESULTADOS

En 2008 las diferencias entre parcelas con plantas libres o con niveles mínimos de PVY (0% y certificada) y con niveles altos de PVY (60 y 100%) fueron significativas pero en 2009 sorprendentemente no hubo tales diferencias y las producciones de todas las parcelas de ensayo fueron muy similares y altas, superiores inclusive al año anterior (Fig. 5.1). En cualquier caso, en ninguno de los años hubo una respuesta significativa al abono nitrogenado de cobertera ni interacciones entre ambos factores (Fig. 5.2). El número de tubérculos por planta fue similar (entre 11 y 15) y sólo en el caso de las parcelas sin PVY se comprobó un cierto efecto en el aumento del tamaño medio del tubérculo con el incremento de N. No hubo efecto significativo en el porcentaje de materia seca de los tubérculos aunque se aprecia una tendencia inversa en 2009 pues en los lotes virosados aumentó ligeramente el porcentaje de materia seca cuando se aumentó el N mientras en los libres de PVY disminuyó (Fig. 5.3). No afectó ni al estado sanitario final de la patata (*Rhizoctonia*, podredumbres, sarna plateada, etc) ni a los daños o deformaciones del tubérculo.

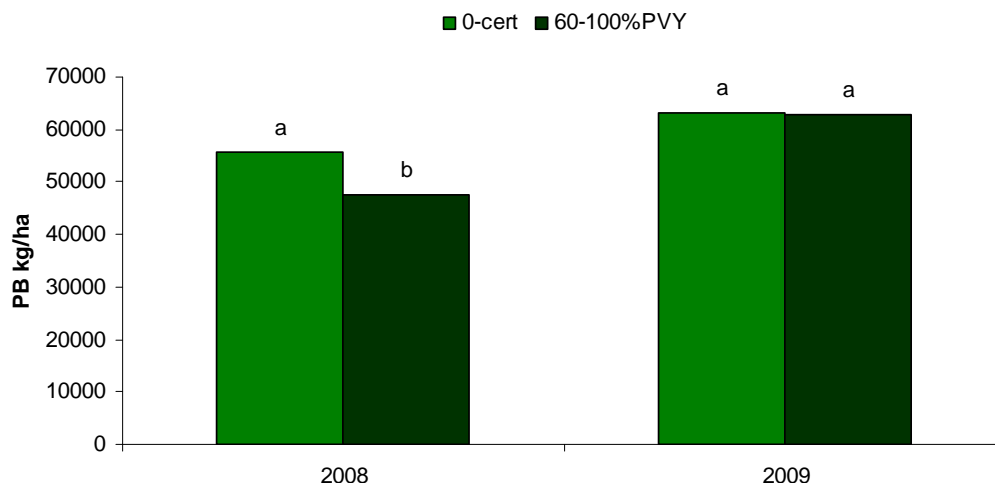


Figura 5.1 Niveles de producción bruta (kg·ha⁻¹) en función del nivel de virosis (0% PVY y certificada / 60-100 PVY) de los lotes de patata de reemplazo de la variedad Kennebec utilizados para siembra en 2008 y 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas entre niveles de virosis con $p < 0,05$ según el test de Tuckey b.

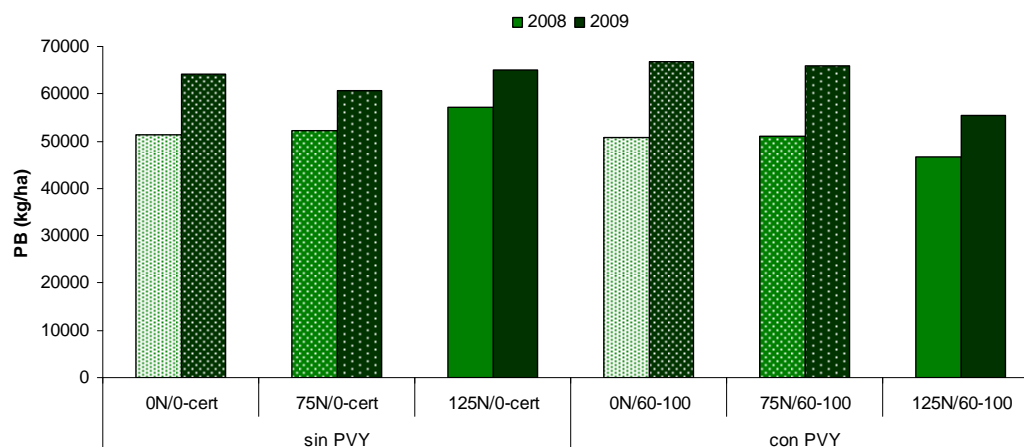


Figura 5.2 Efecto del abonado nitrogenado en cobertera (0-75-125 uds) sobre lotes de patata de siembra Kennebec sin PVY (0% y certificada) y con valores altos de PVY (60 y 100%) en la producción bruta (kg·ha⁻¹) en 2008 y 2009. Sólo hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las producciones de los dos años.

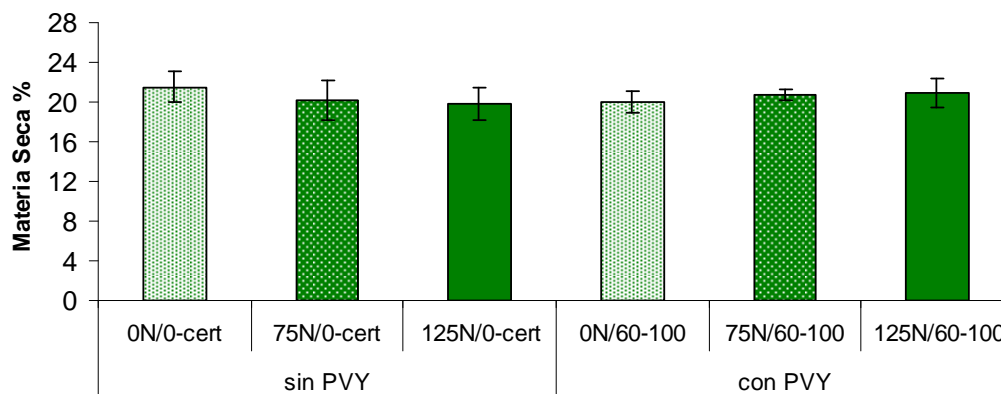


Figura 5.3 Efecto del abonado nitrogenado en cobertera (0-75-125 uds) sobre lotes de patata de siembra Kennebec sin PVY (0% y certificada) y con valores altos de PVY (60 y 100%) en el porcentaje de materia seca (\pm dt) en tubérculo en 2009.

En cuanto a la variedad Fina de Carballo en el ensayo de 2010, el abonado de cobertera no alteró significativamente ($p=0,964$) la respuesta productiva del lote de esta variedad con 100% PVY, aunque con 100 uds. de N hubo un ligero incremento en la producción. El lote libre de virus (con la dosis estándar de N en cobertera, 75 uds) tuvo una producción mayor pero no alcanzó significación estadística.

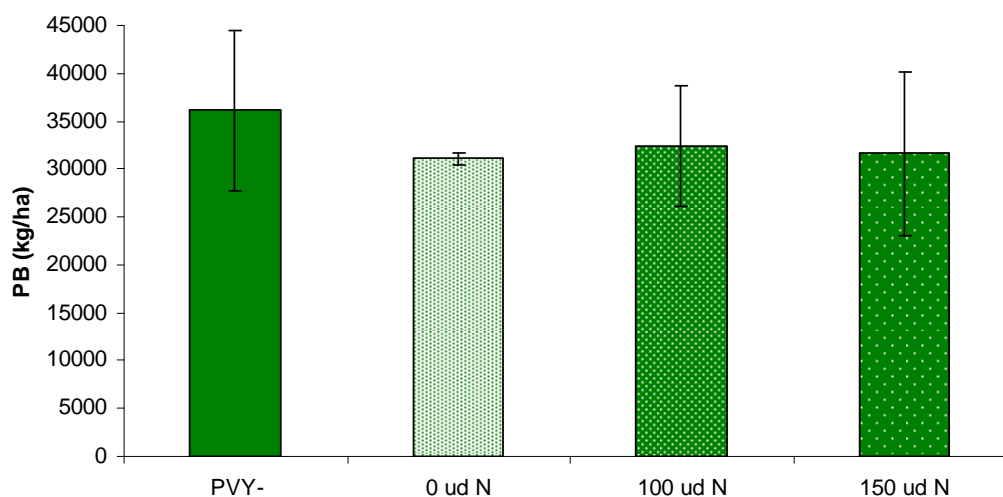


Figura 5.4 Producción ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) \pm dt de lotes de patata de siembra de la variedad Fina de Carballo con 100% PVY y 0% PLRV abonadas en cobertera con 0, 100 ó 150 uds. de N, en comparación con un lote libre de virus con abonado estándar de 75 uds N en cobertera

DISCUSIÓN

Tanto la variedad Kennebec como la Fina de Carballo presentaron una resistencia notable a PVY que hizo que las producciones, en los ensayos, no se vieran significativamente afectadas por la presencia, incluso a niveles del 60 y 100% de este virus. Los resultados del Capítulo 2 apuntan algo en este sentido en la variedad Kennebec en 2011 (Fig. 2.15), pero en 2008 la disminución de producción a medida que se incrementaba el nivel de PVY fue significativa ($p=0,427$; $p=0,003$) como se puede ver en la Tabla 2.3 y figura 2.9. Por tanto parece claro que hay otros factores /circunstancias que pueden aumentar la sensibilidad de Kennebec al PVY. Esta falta de respuesta productiva a los niveles de virosis condiciona notablemente los resultados de los ensayos pues difícilmente se va a ver una compensación de daños cuando éstos no se aprecian. Andrade *et al.* (2008) tampoco observaron grandes diferencias en la producción bruta entre material de reemplazo y certificado pero sí en la calidad general de la cosecha y la producción comercial, lo que no se puede afirmar en este ensayo.

La fertilización de la patata en A Limia se ha estudiado en profundidad en los últimos 15 años (López-Mateo *et al.*, 2004 a y b, López-Mateo, 2007). En la actualidad hay dos formas de abonado habitualmente utilizadas, para una producción esperada de 45.000 kg: (1) una mixta con estiércol de granjas de pollos de engorde con el que, de media, se aportan entre 25 y 30 m³; pero, según el manejo del estiércol, éste pondrá antes o después el N a disposición y a menudo se suelen aportar otras 100 unidades de N; y (2) otra que contempla exclusivamente el uso de abono químico en fondo, con 100 unidades y posteriormente con N de liberación lenta o bien en cobertera donde se aportan otras 80 unidades. Pero, en las condiciones y con los años de aportes previos, hay ensayos que indican que el cultivo no parece necesitar aportes de N en cobertera, lo que hace que prácticamente no haya respuesta a la fertilización o que ésta sea incluso negativa (López-Mateo *et al.*, 2004 a y b). López-Mateo (2007), en diversos ensayos en A Limia, observó respuesta al aumento de fertilización potásica pero no a la nitrogenada. Ya en 2004, en ensayos hechos en las parcelas del Instituto do Campo siguiendo la normativa de Producción Integrada (PI) de patata y reduciendo al mínimo las intervenciones de todo tipo, se comprobó que los aportes de N en cobertera eran innecesarios y no mejoraron ni la producción ni la calidad de la cosecha (Magán, 2005). De hecho, en la mencionada normativa gallega de PI de patata se recomienda “no superar” las 3,5 uds. de N por t de cosecha esperada y, eso, con producciones en regadío

para Kennebec de mas de 40 t·ha⁻¹ supondría ya más de 140 uds. a las que se añadiría el N aportado en su caso por el abono orgánico hasta las 5 uds. de N por t totales recomendadas, lo que hace un total de (200 uds.

Los trabajos citados en la Introducción muestran que determinados cambios en la nutrición mineral del cultivo de patata pueden alterar la respuesta de un cultivo con determinados niveles de virus (Hoveland *et al.*, 1954; Wilson, 1955; Watson y Wilson, 1956); pero no es posible saber qué ocurriría con esa misma fertilización si, además, hay niveles medios de otros virus u otros patógenos presentes en la semilla, o si la variedad tiene mayor o menor resistencia, o la disponibilidad de agua es mayor o menor, etc. Por tanto, aunque es esperable que dado que el PVY acelera el agostamiento de las plantas acortando el ciclo, el abonado nitrogenado en cobertera podría mantener la vegetación verde durante más tiempo y reducir las pérdidas, no se puede asegurar que eso sea así bajo cualquier circunstancia. Esa vegetación más verde y duradera es lo que hace pensar que el abonado nitrogenado puede evitar pérdidas de producción cuando se utiliza patata de reemplazo pero los ensayos de Magán (2004) mostraron que un mejor aspecto de la vegetación, medido como contenido en clorofila. de las parcelas más abonadas, no dio lugar a una mejor respuesta productiva o de calidad y en los ensayos de 2011 (Capítulo 2) no se detectaron menores niveles de clorofila en los lotes más virosados. Los ensayos de Whitworth *et al.* (2006) muestran que, incluso con inoculaciones controladas en material vegetal homogéneo, no hay una respuesta clara al aumento de N ni en variedades con cierta tolerancia como la Russet Norkotah, ni en aquellas muy sensibles como la Russet Burbank. En los ensayos con Kennebec de 2008 y 2009, si no es posible ver diferencias claras entre diferentes niveles de PVY, difícilmente se podrán obtener respuestas a la aplicación de N extra. Dada la variabilidad en las producciones a partir de lotes virosados vista en el Capítulo 2, está claro que son muchos los factores que afectan a los niveles de producción y por tanto también serán muchos los factores que impidan una respuesta directa de los lotes al incremento de N. En variedades con buena resistencia al virus, como Fina de Carballo y, en menor medida, Kennebec, parece que, además de las virosis, hay que tener en cuenta el estado general de la semilla y, sobre todo, el manejo del cultivo que lleve a cabo el agricultor, además de las condiciones ambientales – en secano – y el manejo del riego – en regadío. Por tanto, la recomendación de aumentar abono de cobertera en los casos de siembra condicionada por presencia de PVY, debe ser revisada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrios, G. 2004. Plant Pathology, 5th ed. Academic Press. New York. 635 p.
- Andrade, N., Contreras, A. y Castro, I. 2008. Evaluación comparativa del efecto en el rendimiento y sanidad en el cultivo de la papa al utilizar semilla certificada y sin certificar. Agro Sur 36(2): 111-114.
- Broadbent, L., Gregory, P.H. y Tinsley, T.W. 1952. The influence of planting date and manuring on the incidence of virus diseases in potato crops. Annals of Applied Biology 39(4): 509–524.
- Datnoff, L.E., Elmer, W.H. y Huber, D.M.. 2007. Mineral nutrition and plant disease. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 278 pp.
- Draper, M.D, Pasche, J.S. y Gudmestad, N.F. 2002. Factors influencing PVY development and disease expression in three potato cultivars. American Journal of Potato Research 79:155-165.
- García-Calvo, L. 2002. Estudio de cultivares comerciales de patatas (*Solanum tuberosum* L.). Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Escola Politécnica Superior. Departamento de Producción Vegetal. Universidade de Santiago.
- Hane, D. C. y Hamm, P.B. 1999. Effects of seedborne potato virus Y infection in two potato cultivars expressing mild disease symptoms. Plant Disease 83:43-45.
- Hoveland, C.S., Berger, K.C. y Darling, H.M. 1954. The effect of mineral nutrition on the expression of PLRV Symptoms. Soil Science Society of America Journal 18 (1): 53-55.
- Huber, D.M. y R.D. Watson. 1974. Nitrogen Form and Plant Disease. Annual Review. of Phytopathology 12: 139-165.
- Jarvis, W.R. 1992. Managing Diseases in Greenhouse Crops. APS Press, St. Paul, Minnesota, 288 pp.
- Leadershok, A. 2004. Potato Nitrogen management. J. of veg. crop prod. 10(1): 97-132.
- López Mateo, C., García Calvo, L., Álvarez Rodríguez, E., Fernández Marcos, M.L., y Ferreira, T.C. 2004a. Potato tuber yield and quality in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilisation in NW Spain. Lucrari Scientifice. Anale I.C.D.C.S.Z., 31: 161-174.
- López Mateo, C., García Calvo, L., Álvarez Rodríguez, E., Fernández Marcos, y M.L., Ferreira, T.C. 2004b. Optimizaçao da fertilizaçao da cultura de batata (*Solanum*

- tuberosum*) em A Limia (Galiza, Espanha) para preservar a qualidade ambiental. *Ciencias Agrarias*, 27: 255-265.
- Lopez-Mateo, C. 2007. Efectos agronómicos y ambientales de la fertilización en el cultivo de patata en A Limia (Ourense). Tesis doctoral, Departamento de Edafología e Química Agrícola, Universidade de Santiago de Compostela.
- Magán, M. 2005. Producción integrada de patata en A Limia. Memoria final Trabajo Fin de Carrera Ingenieros Agrónomos, Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela.
- McNew, G.L. 1953. The effects of soil fertility. In: A. Stefferud (ed.) *Plant diseases - The yearbook of agriculture*. USDA Washington, DC. pp. 100-114.
- Meyer, K.M. 2002. Impact of nitrogen management strategies on yield, N-use efficiency and rhizoctonia diseases of Irish potato. Master Sc thesis, Graduate Faculty of North Carolina State University, USA.
- Nolte, P., Whitworth, J.L., Thornton, M.K. y McIntosh, C.S. 2004. Effect of seedborne Potato virus Y on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato. *Plant Disease* 88:248-252.
- Ohms, R.E., Painter, C.G. y Jones, J.P. 1977. Comparison of nitrogen and phosphorus requirements between PVX free and regular Russet Burbank potato seed stocks. *American Journal of Potato Research.*, 54(9): 425-436.
- Salazar L.F. 2003. Potato viruses after the XXth century: Effects, dissemination and their control. Entrada el 3/12/2003, consultado el 11/04/2012. URL: http://www.crawfordfund.org/assets/files/awards/Potato_Viruses_after_the_20th_Century.pdf
- Spaar, D. y Harmann, U. 1977. Kartoffel. En: Klinkowski. M. *et al.* Ed. *Pflanzliche Virologie*, vol. 3, 3rd edicion, Akademie-Verlang, Berlin, p.63-113. Citado por Sutic, D.D., Ford, R.E. y Tosic M.L. (eds). 1999. *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, USA. Capitulo 4.
- Watson, D.J. y Wilson, J.H.. 1956. An analysis of the effects of infection with leafroll virus on the growth and yield of potato plants, and of its interactions with nutrient supply and shading. *Annals of Applied Biology* 44(3): 390-409.
- Whitworth, J. L., Nolte, P., McIntosh, C. y Davidson, R. 2006. Effect of Potato virus Y on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels. *Plant Disease* 90:73-76.

Wilson, J.H. 1955. Effects of nutrition and light intensity on symptoms of leafroll virus infection in the potato plant. *Annals of Applied Biology* 43(2): 273–287.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1

1. Los factores que más condicionan la calidad de la patata para reemplazo son el tipo de producción que lleva a cabo el agricultor y las peculiaridades del año.
2. El patógeno que da lugar a más recomendaciones de “no siembra” es PLRV, sobre todo cuando va asociado a PVY, por considerar que es el que más reduciría la producción.
3. *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Phoma spp.*, *Fusarium spp.* y bacterias de podredumbre aparecen solo ocasionalmente en la mayoría de los lotes de todos los tipos de producción y todos los años.
4. *Helminthosporium solani*, la sarna plateada, aparece en porcentajes elevados en general y parece haber una tendencia a aumentar con los años.
5. La producción de patata específicamente para siembra, siguiendo las normas de producción de patata de siembra certificada, permite a algunos agricultores de A Limia conseguir un material de siembra de calidad aceptable.
6. A la vista de los resultados de los 4 primeros años de programa de análisis de patata de reemplazo, se concluye que el aprovechamiento de calibres pequeños de patata de consumo para siembra tiene riesgos altos y nunca debe ser sembrada sin previo análisis.

CAPÍTULO 2

1. La producción bruta y comercial de Agria y Kennebec disminuye a medida que aumenta el nivel de virosis del lote de reemplazo pero no se manifiesta claramente hasta niveles relativamente altos cuando las condiciones de cultivo son óptimas.
2. La escala de recomendación de siembra utilizada permite descartar los lotes que podrían producir las mayores pérdidas de producción; la causa principal de descalificación es la coincidencia de PVY y PLRV y que la suma de ambos supere el 20%.
3. La variedad Fina de Carballo presenta una excelente tolerancia al PVY y, en menor medida a PLRV, sin que se produzcan descensos significativos de

producción incluso en lotes con el 60 y el 100%, en ninguno de los años evaluados.

CAPÍTULO 3

1. La concentración tanto de PVY como de PLRV en las plantas y tubérculos, no es homogénea y varía con el tiempo; por tanto, la muestra y el tamaño de brote afectan al resultado de los análisis serológicos.
2. El protocolo de inmunopresión directa (DIP) propuesto tiene suficiente sensibilidad para la detección de PVY y PLRV, permitiendo obtener los resultados en menos tiempo que el DAS-ELISA, con un coste muy inferior y dentro de una jornada laboral.
3. El coste de materiales y reactivos por muestra podría ser inferior a 10 céntimos de euro.
4. El protocolo de DIP-ELISA propuesto mejora los propuestos por otros autores tanto a nivel de costes como de tiempos de realización y ha sido posible su transferencia al sector.

CAPÍTULO 4

1. Un cultivo borde de maíz puede conseguir niveles de transmisión de PVY bajos en zonas de cultivo de patata de consumo pero debe rodear completamente el cultivo y debe evitarse la proximidad a fuentes de inóculo.
2. La distribución espacial de plantas con PVY en la parcela de ensayo en 2004 se relacionó con la localización de fuentes de inóculo cercanas sólo en la parcela sin borde de maíz.
3. El aceite mineral es el que consigue una mayor protección del cultivo frente a la transmisión de PVY y, en algunos casos, también funciona bien el aceite de soja pero es necesario realizar muchas aplicaciones y los niveles de protección no son suficientes si hay poblaciones de vectores e inóculo elevadas.
4. Ni los tratamientos ni los cultivos borde afectaron a la producción y calibre de los tubérculos producidos.

CAPÍTULO 5

1. Tanto la variedad Kennebec como la Fina de Carballo presentan una tolerancia elevada a la presencia de PVY cuando se cultivan en condiciones óptimas tanto ambientales como de manejo.
2. En esas condiciones, el abonado nitrogenado suplementario en cobertera no mejoró las producciones, ni siquiera de los lotes con niveles altos de PVY, ni en Kennebec ni en Fina de Carballo.
3. Las recomendaciones de aumento de N en cobertera que se vienen haciendo para compensar niveles altos de PVY en patata de reemplazo, deben ser revisadas para evitar el uso excesivo de abonado nitrogenado por sus posibles consecuencias medioambientales.

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

1. La práctica de aprovechamiento de patata de consumo de pequeño calibre sin control puede dar lugar a la siembra de lotes que impedirá un cultivo rentable y con alto riesgo de aumento de problemas fitopatológicos.
2. Los agricultores de A Limia tienen los conocimientos y tecnología suficiente como para producir su propia patata de siembra y pueden conseguir niveles de virosis y otros daños similares a los de la patata de siembra certificada a coste competitivo.
3. Este tipo de programas de análisis y asesoría es fundamental para minimizar los riesgos del reemplazo y el sector en A Limia – agricultores y empresas de servicios - está maduro para asumir su desarrollo.